N° d'enregistrement
au CNRS A. O. 2255

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Monsieur René MONÉGER

Sujet de la 1re Thèse :

Contribution à l'étude de l'influence exercée par la lumière sur la biosynthèse des caroténoïdes chez la *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden

---

Sujet de la 2me Thèse :

Mise au point d'une méthode de microanalyse pour l'étude des caroténoïdes de petits échantillons de végétaux étiolés

soutenues le 18 Avril 1968 devant la Commission d'Examen

MM. CHOUARD Président
MOYSE, ULRICH } Examinateurs

N° d'enregistrement
au CNRS A. O. 2255

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Monsieur René MONÉGER

Sujet de la 1re Thèse :

Contribution à l'étude de l'influence exercée par la lumière sur la biosynthèse des caroténoïdes chez la *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden

---

Sujet de la 2me Thèse :

Mise au point d'une méthode de microanalyse pour l'étude des caroténoïdes de petits échantillons de végétaux étiolés

soutenues le 18 Avril 1968 devant la Commission d'Examen

MM. CHOUARD Président
MOYSE, ULRICH } Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Physiol. Vég., 1968, **6** (2), 165-202.

Contribution à l'étude de l'influence exercée par la lumière sur la biosynthèse des caroténoïdes chez la *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden [1]

René MONÉGER

Laboratoire de Physiologie Végétale de la Sorbonne, 1, rue Victor-Cousin, Paris-5e, France

(Manuscrit reçu le 6 mars 1968)

RÉSUMÉ

L'action de la lumière sur la synthèse des caroténoïdes est étudiée dans les frondes de *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. Les pigments liposolubles courants chez les Angiospermes (chlorophylles *a* et *b*, β-carotène, lutéine, époxylutéine, violaxanthine et néoxanthine) sont présents. Dans les frondes étiolées, les teneurs sont faibles, surtout pour le β-carotène.

Une importante dilution isotopique du ^{14}C provenant du bicarbonate est constatée dans les caroténoïdes des frondes cultivées à la lumière sur milieu saccharosé. Le taux d'incorporation à la lumière du ^{14}C du bicarbonate dans les caroténoïdes des frondes étiolées dépend du temps écoulé depuis le début de l'éclairement. La vitesse de synthèse des tétraterpènes plafonne avant que la fixation photosynthétique du carbone minéral n'ait atteint son intensité maximale. Les spectres d'action traduisent, par effet cinétique, l'intervention, d'un phénomène lié à l'activité photosynthétique, mais distinct de la fixation trophique de carbone minéral.

Dans les frondes étiolées, la puromycine exalte à l'obscurité la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes. L'aptitude des frondes à incorporer l'acétate exogène dans les tétraterpènes croît durant les premières heures d'éclairement. Elle se maintient pendant plusieurs dizaines de minutes après le retour à l'obscurité.

SUMMARY

Action of light on carotenoid synthesis is investigated in fronds of Spirodela polyrrhiza *(L.) Schleiden. Liposoluble pigments usually found in Angiosperms (chlorophylls* a *and* b, β-*carotene, lutein, lutein-epoxyde, violaxanthin and neoxanthin) are present. In etiolated fronds, the amounts are small, particularly for* β-*carotene.*

Illuminated fronds cultivated on sucrose-containing nutrient medium show, in carotenoids, a marked isotopic dilution of ^{14}C *incorporated from bicarbonate. The rate of light incorporation of* ^{14}C *from bicarbonate in the carotenoids of etiolated fronds depends on the time of illumination. Tetraterpene synthesis is limited before photo-*

---

[1] Ce travail constitue l'essentiel d'une Thèse de Doctorat d'Etat (Sc. nat.) présentée à la Faculté des Sciences de Paris en 1968 et qui porte le N° A.O. 2.255 à l'enregistrement du Centre National de la Recherche Scientifique.

synthetic fixation of mineral carbon has reached its higher intensity. The action spectra reflects, by kinetic effect, the intervention of a phenomenon which is linked to photosynthetic activity, but distinct from trophic fixation of mineral carbon.

In etiolated fronds, puromycin stimulates in darkness carotenoid synthesis and accumulation. The ability of fronds to incorporate exogene acetate in carotenoids increase during the first hours of illumination. It keeps on during several ten minutes after fronds have been returned to darkness.

INTRODUCTION

L'influence de la lumière sur la coloration des organes chlorophylliens chez les plantes supérieures autotrophes est un fait d'observation courante. La croissance à l'obscurité se traduit chez ces végétaux par une pigmentation réduite qui constitue l'une des caractéristiques de l'étiolement. Le phénomène intéresse l'ensemble des pigments liposolubles des chloroplastes, mais il affecte différemment chlorophylles et caroténoïdes : tandis que les pigments tétrapyrroliques ne sont généralement représentés, chez les Angiospermes totalement étiolées, que par des traces de protochlorophylle (VIRGIN, 1964 ; WIECKOWSKI et GOODWIN, 1967), les teneurs en composés tétraterpéniques ne sont pas négligeables, même dans les conditions d'obscurité les plus rigoureuses. Elles restent cependant très inférieures à celles qui se rencontrent chez les végétaux normalement éclairés (KAY et PHINNEY, 1956 ; GOODWIN, 1958*a*, 1958*b*, 1960 ; GOODWIN et PHAGPOLNGARM, 1960 ; MONÉGER, 1965) et la différence est sensiblement plus marquée pour les carotènes, qui ne sont présents parfois qu'à l'état de traces (BLAAUW-JANSEN, KOMEN et THOMAS, 1950 ; KAY et PHINNEY, 1956) que pour les xanthophylles (MONÉGER, 1968*a*). La production des caroténoïdes chez les Angiospermes autotrophes est donc stimulée par la lumière (BANDURSKI, 1949 ; WIECKOWSKI et GOODWIN, 1967). L'exposition de végétaux étiolés à la lumière blanche provoque dans les plastes (GOODWIN, 1958*b* ; DURANTON, 1964) une synthèse active de caroténoïdes qui, en conjugaison avec la formation de chlorophylle (VIRGIN, 1964 ; BOGORAD, 1965 ; BOARDMAN, 1966) manifestée par le verdissement, aboutit, après quelques dizaines d'heures, à l'établissement d'une pigmentation normale (GOODWIN, 1958*b*).

Le contrôle exercé par la lumière sur la synthèse des pigments liposolubles, et notamment sur celle des caroténoïdes, a de longue date éveillé la curiosité des chercheurs. Mais, en 1962, lorsque ce travail a été commencé, les recherches dans ce domaine n'avaient encore pris qu'un essor limité, et les informations réunies sur ce sujet restaient trop fragmentaires et dispersées pour permettre de formuler autre chose que des suppositions. Chez le végétal vivant en régime exclusivement photoautotrophe, l'activité photosynthétique constitue l'unique source susceptible de fournir les chaînons organiques carbonés nécessaires aux synthèses de matière vivante en général, et de caroténoïdes en particulier. Il s'agissait de préciser si le rôle de la lumière dans la caroténoïdogenèse restait limité à l'aspect trophique du phénomène photosynthétique, ou bien s'il en débordait le cadre. Dans cette dernière éventualité, l'examen strictement spéculatif de ce problème physiologique fondamental conduisait à envisager soit une action directe de la lumière (sur une éventuelle étape proprement photochimique de la séquence biosynthétique qui assure la transformation en caroténoïdes de matériaux carbonés d'origine photosynthétique),

soit une intervention indirecte de l'éclairement (dans l'élaboration des structures et de l'équipement biochimique et oligodynamique qui conditionne le passage et le maintien à l'état fonctionnel des sites caroténoïdogénétiques, ou encore dans la levée d'inhibitions scotoinduites ou photolabiles).

BANDURSKI (1949), estimant les teneurs des caroténoïdes après simple séparation en deux fractions contenant l'une les carotènes, l'autre les caroténols, avait mis en évidence l'influence des sucres sur la caroténosynthèse dans les fragments de limbes de Haricot en survie sur solution nutritive ; ses expériences soulignaient en outre l'importance de l'activité photosynthétique. Les travaux de BEEKMANN (1953, 1954), portant sur des plantules de Blé étiolées, avaient confirmé le rôle essentiel des réserves et du métabolisme glucidiques dans les synthèses caroténoïdiennes nettes, évaluées par examen spectrophotométrique d'extraits benzéniques globaux. Ces informations, obtenues sans le secours de techniques isotopiques, mettaient l'accent sur l'aspect trophique de l'intervention de la lumière dans la synthèse des caroténoïdes. Par ailleurs, des recherches menées sur des organismes non chlorophylliens avaient fait apparaître le rôle précurseur de l'acétate (GROB et *al.*, 1951 ; SCHOPFER et GROB, 1952) et du mévalonate (GROB, 1957) dans la caroténoïdogenèse. Tandis que ces résultats étaient étendus aux tissus de la racine de Carotte (BRAITHWAITE et GOODWIN, 1957), GOODWIN (1958*a*, 1958*b*) avait étudié l'incorporation de radioactivité dans le β-carotène de germinations étiolées de Maïs, éclairées pendant 24 h à 28 °C en présence de précurseurs marqués au carbone 14. Avec l'acétate, le marquage du β-carotène n'était pas décelable. Il restait très faible avec le mévalonate. Pourtant, la teneur des tissus en β-carotène était multipliée par 5 ou 10 pendant l'illumination, et le matériel insaponifiable accusait une incorporation considérable de carbone radioactif. La mise en contact des germinations, durant 24 h d'obscurité précédant l'illumination, avec le substrat radioactif, n'en améliorait pas l'incorporation dans le carotène. Avec le $^{14}CO_2$ au contraire, GOODWIN avait observé une incorporation nettement préférentielle dans le β-carotène par rapport aux autres constituants de l'insaponifiable. L'étude dans les mêmes conditions du métabolisme du phytol des chlorophylles avait donné lieu à des observations tout à fait semblables (MERCER et GOODWIN, 1962). Aucun de ces éléments expérimentaux ne laissant supposer que l'illumination déclenchait la conversion en β-carotène de précurseurs formés à l'obscurité, GOODWIN (1958 *a*, 1960) considérait que l'absence d'incorporation de l'acétate et du mévalonate dans le β-carotène traduisait très probablement l'impossibilité pour leurs molécules d'atteindre les sites de la biosynthèse caroténoïdienne dans le chloroplaste, et que le pigment était synthétisé *de novo*, à partir du CO_2 fixé par photosynthèse, dans le chloroplaste nouvellement développé. Cette hypothèse, précisée par la notion d'imperméabilité relative de la membrane chloroplastique au mévalonate, complétée par l'idée d'une ségrégation enzymatique (GOODWIN et MERCER, 1963) et étayée par des faits expérimentaux (ROGERS, SHAH et GOODWIN, 1965, 1966), devait un peu plus tard être érigée en théorie générale de la régulation du métabolisme des terpénoïdes (GOODWIN, 1965 *a*, 1965 *b*, 1967). Dans cette optique, l'intervention de la lumière dans la caroténoïdogenèse se présentait comme la conséquence de son action sur la production photosynthétique, au niveau même des sites chloroplastiques où se déroule l'élaboration des caroténoïdes, de la matière première spécifique utilisée dans cette élaboration.

Cette interprétation séduisante, en accord avec les observations de BANDURSKI (1949) qui mettaient en relief l'importance de l'activité photosynthétique, laissait dans l'ombre cependant le rôle des glucides cellulaires. L'accroissement de la caro-

ténosynthèse nette constatée en présence de sucres exogènes et l'influence exercée par les réserves glucidiques et leur métabolisme sur les teneurs en caroténoïdes (BEEKMANN, 1953, 1954), ne pouvaient, en raison de leur annulation complète par l'addition de fluorure, être imputés à un simple ralentissement, sous l'effet protecteur des glucides, de la dégradation des carotènes (BANDURSKI, 1949). Rien n'interdisait, par contre, d'y voir le reflet d'une participation trophique de ces substances (ou de leurs dérivés) à l'anabolisme tétraterpénique. En d'autres termes, si une très faible proportion seulement du mévalonate fourni dans le milieu parvenait jusqu'aux sites de synthèse, il n'était pas exclu que les glucides cellulaires fussent susceptibles, eux, de pénétrer, sous une forme ou sous une autre, les structures chloroplastiques pour être engagés dans les voies de la biosynthèse caroténoïdienne. D'ailleurs, les incorporations substantielles de ^{14}C-acétate observées par COSTES (1962), dans les caroténoïdes de feuilles étiolées de Maïs exposées à la lumière, militaient en faveur de l'idée selon laquelle le chloroplaste était capable d'absorber des quantités notables de précurseurs caroténoïdiens autres que le mévalonate. Dans ce cas, l'imperméabilité des membranes chloroplastiques au mévalonate, premier précurseur spécifique des caroténoïdes, ne pouvait être considérée comme l'unique mécanisme impliqué dans la régulation des synthèses caroténoïdiennes, et le contrôle exercé sur elles par la lumière ne se limitait peut-être pas à la fourniture de précurseurs d'origine photosynthétique, la pénurie de ces derniers pouvant dès lors être palliée par le matériel d'origine glucidique présent dans les réserves tissulaires du végétal.

Il ne paraissait donc pas impossible que l'action de l'éclairement sur la caroténoïdogenèse fît intervenir (à côté de la contribution trophique apportée, par la voie de la production photosynthétique des chaînons carbonés organiques, à l'élaboration de la matière première) d'autres mécanismes distincts du premier et plus ou moins indépendants de lui. Insérée dans le cadre plus général des effets morphogénétiques divers produits par la lumière, cette éventualité ne présentait *a priori* rien de surprenant. L'existence, chez les végétaux étiolés, même approvisionnés en matériel organique susceptible de subvenir aux besoins d'un organisme vivant en régime hétérotrophe (c'est le cas des plantules qui se développent à l'obscurité à partir des réserves disponibles dans la graine), d'anomalies importantes affectant entre autres la biochimie, la structure, la morphologie, la pigmentation... révèle une disharmonie entre les diverses activités biochimiques des tissus et traduit le caractère incomplet de l'équipement enzymatique de ces plantes. Le plaste est l'organite cellulaire le plus étroitement adapté à la fixation et aux utilisations de l'énergie lumineuse. Il doit donc porter une grande part de responsabilité dans les altérations profondes relevées en l'absence de lumière chez les organismes normalement photoautotrophes. On peut imaginer par conséquent que la lumière ait pour effet la mise en place, dans l'étioplaste (KIRK, 1967), de structures et d'équipements biochimiques nécessaires, non seulement à l'exercice du pouvoir photosynthétique d'élaboration des composés organiques, mais encore à un ensemble complexe d'activités oligodynamiques conditionnant l'aspect morphogénétique de l'évolution ultérieure du végétal, et notamment sa pigmentation. La comparaison attentive de certains des résultats obtenus par BANDURSKI (1949) inspirait une remarque de nature à accréditer ces vues. Dans les fragments foliaires en survie à la lumière sur solution nutritive saccharosée, l'addition d'hydroxylamine (inhibiteur de l'activité photosynthétique) dans le milieu réduisait la synthèse nette des caroténoïdes, tandis que l'appauvrissement en CO_2 de l'atmosphère l'augmentait (tableau I). Or, la réduction de l'approvisionnement en gaz carbonique, exerçant probablement sur l'élaboration

TABLEAU I

Effets de l'hydroxylamine et de la privation de CO_2 sur la synthèse nette de carotène dans des fragments de limbe de Haricot en survie, à la lumière, sur solution nutritive saccharosée

D'après BANDURSKI (1949)

Synthèse nette mesurée par différence avec des témoins fixés immédiatement avant l'expérience, en µg/g de matière fraîche initiale (15 fragments de limbe par mesure).

Expérience N°	Traitement	Nombre d'essais	Synthèse de carotène
XII	Saccharose + CO_2	5	49,6 ± 1,96
	Saccharose + NH_2OH + CO_2	6	31,8 ± 2,04
VII	Saccharose + CO_2	5	18,8 ± 2,35
	Saccharose − CO_2	3	26,3 ± 1,67

des chaînons organiques carbonés, plus que sur les phénomènes photochimiques de fixation d'énergie et de production de photoréducteurs, son action inhibitrice, aboutissait à dissocier en quelque sorte ces deux aspects de l'activité photosynthétique. Une des explications possibles de ces résultats aurait donc consisté à admettre par exemple qu'en régime de carence en CO_2, les produits photochimiques non utilisés à la réduction de l'oxydant biologique naturel restaient disponibles pour intervenir, notamment, dans certaines des réactions biochimiques de synthèse du carotène. Mais une telle interprétation n'aurait pu être émise qu'en présence de données permettant d'écarter irréfutablement un éventuel effet sur la dégradation des tétraterpènes (GOODWIN, 1952 ; FRANK et KENNEY, 1955) plutôt que sur leur synthèse.

De nouvelles expériences étaient donc nécessaires pour préciser certains aspects des mécanismes qui placent la synthèse des caroténoïdes sous la dépendance de l'éclairement.

I. OBJECTIFS ET MOYENS EXPÉRIMENTAUX

A. — CHOIX D'UN MATÉRIEL ET D'UN PROTOCOLE GÉNÉRAL D'EXPÉRIMENTATION

Pour distinguer la production et la dégradation de caroténoïdes, le bicarbonate et l'acétate marqués au ^{14}C ont été utilisés comme précurseurs. Le souci de faciliter la fourniture de radioactivités spécifiques élevées, de répondre aux impératifs conjugués de pureté spectrale et de niveau énergétique des éclairements oligochromatiques, et de simplifier les problèmes de climatisation des enceintes de culture, a suscité le choix d'un matériel peu encombrant. L'Angiosperme retenue pour les expériences est une Lemnacée : la *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden.

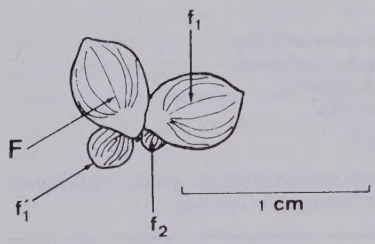

FIG. 1. — Vue de dessus d'une colonie élémentaire de *Spirodela polyrrhiza* récoltée dans son milieu naturel, d'après LANDOLT (1957).
F : fronde mère ; f_1, f'_1, f_2 : frondes filles.

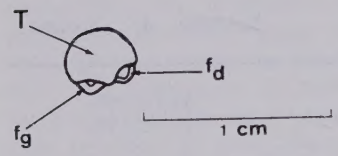

FIG. 2. — Organisation générale d'un turion de *Spirodela polyrrhiza*, d'après GUERN (1965).
T : turion ; f_g, f_d : fossettes de bourgeonnement gauche et droite.

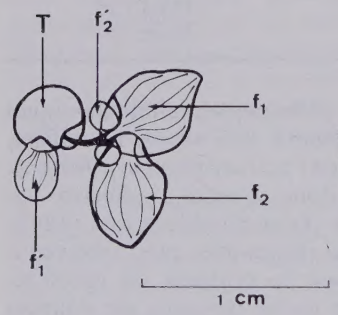

FIG. 3. — Germination à la lumière d'un turion de *Spirodela polyrrhiza*, d'après GUERN (1965).
T : turion ; f_1 : fronde droite de 1re génération ; f'_1 : fronde gauche de 1re génération ; f_2 : fronde droite de 2e génération ; f'_2 : fronde gauche de 2e génération.

Dans la nature, ses frondes arrondies (fig. 1), de 0,5 à 1 cm de diamètre, peuplent la surface des eaux calmes ; elles se développent bien en laboratoire sur milieu synthétique liquide minéral (PIRSON et SEIDEL, 1950 ; HUTNER, 1953 ; LANDOLT, 1957 ; MARTIN, 1963) ou sucré (KANDELER, 1962) ; leur aptitude à absorber les éléments présents dans les solutions nutritives favorise l'incorporation de facteurs divers (GUERN, 1965) et d'isotopes radioactifs (MONÉGER, 1966). Leur multiplication active donne naissance à des clones qui comportent sous un faible volume un nombre élevé d'individus (KANDELER, 1960-61) et qui sont, par conséquent, susceptibles de fournir des échantillons homogènes, représentatifs et peu encombrants. Les hibernacles ou « turions » (fig. 2), organes de résistance qui sont formés dans la nature à la fin de l'été ainsi qu'en culture (CZOPEK, 1963) et qui, après levée de dormance par le froid, germent (fig. 3) au retour des conditions favorables, peuvent être conservés à une température voisine de +5 °C et constituent une source de matériel expérimental disponible en toutes saisons. Les frondes planes, pourvues à la face inférieure d'un faisceau de racines à effet stabilisateur, sont capables de constituer, dans des conditions de vie normales, un tapis uniforme et régulier qui se prête bien aux expériences d'éclairement contrôlé et évite les inconvénients de l'emploi d'un matériel en survie (BANDURSKI, 1949). Leur mode de vie aquatique dispense du délicat contrôle hygrométrique de l'atmosphère des enceintes de culture. Les principaux pigments chloroplastiques des feuilles de Phanérogames sont bien représentés dans les frondes normales provenant soit de récoltes dans la nature, soit de cultures à la lumière blanche (MONÉGER, 1965). Les frondes qui se forment dans les cultures sur

milieu stérile sucré maintenues à l'obscurité (GORHAM, 1950) présentent une coloration jaunâtre. Leur développement est favorisé par la présence de kinétine ou de benzylaminopurine (HILLMAN, 1957). La germination à l'obscurité sur solution minérale, additionnée (CZOPEK, 1964) ou non (CZOPEK, 1964 ; MONÉGER, 1965) de kinétine, à la concentration de 10^{-6} M à 10^{-5} M, des turions récoltés dans la nature à l'automne ou au laboratoire en toutes saisons permet d'obtenir des frondes à pigmentation particulièrement faible (MONÉGER, 1965), dont le verdissement sous l'action de la lumière s'accomplit en un temps relativement long. Ainsi, en dépit de leur taille réduite, ces frondes, qui permettent d'assister à une sorte de ralenti des synthèses caroténoïdiennes, sont, pour en étudier les toutes premières étapes, un matériel de choix. En effet, les dérèglements du métabolisme constituent généralement un excellent point d'attaque pour aborder l'analyse des phénomènes dont ils expriment la perturbation, surtout s'il est possible de saisir les tout premiers stades du retour à la normale. Il était donc indispensable de pouvoir faire largement appel aux sujets d'expérience obtenus par germination des turions à l'obscurité.

Mais, compte tenu des dimensions réduites auxquelles les échantillons sont voués pour les raisons indiquées plus haut, les expériences portant sur ce matériel à peine pigmenté comportent des manipulations d'extraits contenant seulement quelques μg de caroténoïdes totaux. Or, le recours à l'estimation des pigments dans l'extrait global (BLAAUW-JANSEN et *al.*, 1950 ; BEEKMANN, 1953, 1954 ; FRANK et KENNEY, 1955 ; COHEN et GOODWIN, 1962 ; HENSHALL et GOODWIN, 1964) ou à la simple séparation en deux fractions contenant, l'une des carotènes, l'autre les xanthophylles (von EULER et HELLSTROM, 1929 ; BARRENSCHEEN et *al.*, 1942 ; BANDURSKI, 1949 ; BLAAUW-JANSEN et *al.*, 1950) n'est pas possible, puisque les mesures d'incorporation de radioactivité exigent la purification des pigments et le dosage individuel.

Comme il n'était possible de faire appel, pour accroître la concentration pigmentaire des extraits, ni à la masse des échantillons expérimentaux comme l'ont fait MOSTER et QUACKENBUSH (1952), KAY et PHINNEY (1956) et GOODWIN (1958 *b*), ni à la durée des éclairements comme GOODWIN (1958 *a*, 1958 *b*) et BILLOT et LEROY (1960), une microméthode a été mise au point pour permettre l'analyse, dans des conditions de précision satisfaisantes, des très faibles quantités de caroténoïdes. Un second objectif est ainsi précisé : ouvrir une voie nouvelle de recherche en élaborant les moyens de travailler avec précision sur des échantillons réduits d'un matériel à peine pigmenté.

B. — TECHNIQUES GÉNÉRALES

Pour assurer aux cultures des conditions de température et d'éclairement rigoureusement contrôlées, un ensemble climatique a été construit (MONÉGER, 1968*b*). Les frondes sont cultivées sur solution nutritive dans des fioles de Fourneau ou de Matras dont la partie inférieure plonge dans un bain thermostatique. La température de l'atmosphère fait l'objet d'une régulation séparée. Les cultures sont ainsi maintenues à une température constante ($25 \pm 0{,}15$ °C, sauf indication contraire). Un plafond lumineux, commandé par une horloge, fournit, aux moments voulus, un éclairement adaptable, en intensité, qualité, et durée, aux nécessités de l'expérimentation. Dans les expériences qui vont être décrites, la lumière était fournie par des lampes Mazda (incandescence, modèle extensif, 6 000 lx au niveau des cultures).

Les échantillons de frondes normalement pigmentées sont prélevés soit dans des cultures sur milieu minéral (PIRSON et SEIDEL, 1950 ; HUTNER, 1953), soit dans des souches entretenues stérilement sur milieu saccharosé (10 g/l). Dans ces dernières se produit par ailleurs, si l'on s'abstient,

pendant une vingtaine de jours, d'en renouveler le milieu sucré, une formation active de turions. Ceux-ci, après séjour au froid, peuvent, au même titre que les hibernacles récoltés dans leur milieu naturel (MONÉGER, 1965), germer en cellule obscure, à 28 °C, en présence de kinétine, pour donner naissance à des frondes étiolées de taille réduite, mais de forme normale. La benzylaminopurine qui, comme la kinétine, stimule la germination des turions (GUERN, 1965) n'est pas utilisée, car elle provoque une levée de dominance qui s'accompagne généralement d'une réduction de taille de la fronde dominante. Les échantillons expérimentaux sont constitués avec les frondes dominantes ainsi obtenues et séparées, en lumière très faible, de leur turion, plutôt qu'avec les frondes étiolées qui se forment dans les cultures stériles sur sucre placées à l'obscurité et dont la morphologie quelque peu tourmentée convient mal aux expériences d'éclairement contrôlé. La répartition au hasard, dans des flacons à tare de 50 mm de diamètre, d'un nombre d'individus suffisant (environ 200) pour occuper la totalité de la surface disponible (19,6 cm^2), fournit des échantillons hautement représentatifs d'un matériel génétiquement homogène (puisqu'il est issu d'un clone) et formé dans des conditions aussi rigoureusement identiques que possible (MONÉGER, 1968*b*).

Un équipement spécialement conçu pour assurer, à température contrôlée, les traitements lumineux en lumière blanche ou colorée, a été mis au point (MONÉGER, 1968*b*). Comportant deux cellules indépendantes, il permet de traiter différemment, mais en même temps, deux échantillons. L'énergie provient d'une lampe au xénon, et les radiations nécessaires sont sélectionnées par des filtres interférentiels de bande passante étroite (10 à 12 nm) et de transmission élevée (proche de 70 %). Les puissance lumineuses obtenues atteignent 500 $\mu W\ cm^{-2}$. L'illuminateur à réseaux décrit par JACQUES et *al.* (1964) a été utilisé récemment pour obtenir des puissances supérieures (jusqu'à 2 000 $\mu W\ cm^{-2}$). En permettant une dizaine de traitements lumineux différents simultanés, il apporte au problème des témoins une solution élégante.

En raison de son mode de nutrition habituel, le matériel aquatique choisi incorpore aisément les précurseurs marqués fournis en solution, même pour $^{14}CO_2$ sous forme de bicarbonate (CHAMPIGNY, 1959) dans le milieu nutritif. Des prélèvements effectués, avant et après le traitement expérimental, dans les milieux portant les échantillons, ainsi que dans un milieu témoin dépourvu de frondes, permettent d'évaluer commodément l'incorporation totale de radioactivité, et notamment d'apprécier l'activité photosynthétique pendant la durée des illuminations.

A l'issue du traitement expérimental, le matériel est fixé dans l'azote liquide, puis lyophilisé (MONÉGER, 1968*b*). A la fin de la lyophilisation, le vide est cassé par de l'azote pur sec, et les échantillons peuvent être, en attendant les opérations d'analyse, conservés à sec, sous azote, à −20 °C, en tube de verre scellé à la flamme. Ces procédés, adoptés dès le début de ces recherches, présentent de nombreux avantages (MONÉGER, 1965). La matière sèche représente généralement moins de 10 % de la matière fraîche. Après un broyage à froid, sous azote et dans l'acétone anhydre, les pigments sont extraits par filtration.

Une petite fraction aliquote, destinée au dosage global des chlorophylles (MACKINNEY, 1941 ; ARNON, 1949) ou à leur séparation (PERKINS et ROBERTS, 1962 ; LABORIE, 1963), est éventuellement prélevée. L'extrait subit ensuite, pendant 15 h, une saponification à froid par la potasse. Les caroténoïdes, repris par l'éther de pétrole, sont séparés sur colonne de poudre de cellulose (DURANTON, GALMICHE et ROUX, 1958), selon la technique chromatographique standardisée par COSTES (1958, 1965*b*). Les pigments élués sont identifiés et dosés spectrophotométriquement en lumière visible. Dans les expériences d'incorporation de ^{14}C, ils doivent être soigneusement purifiés avant d'être soumis au comptage de radioactivité. La technique de purification par cristallisations répétées à laquelle certains auteurs (LOWRY et CHICHESTER, 1967) restent très attachés, est impraticable avec des extraits de concentration minime. Les techniques de purification chromatographique indiquées par COSTES (1962, 1965*b*) sont plus expéditives. Elles ont été adoptées après contrôle, sur chromatoplaques d'acide silicique, de la pureté des fractions qu'elles permettent d'obtenir à partir de frondes étiolées, de frondes en voie de verdissement ou de frondes normales.

Les radioactivités sont comptées en scintillation liquide, au moyen d'un spectromètre Packard 3375 dont l'étalon externe permet de disposer d'une bonne appréciation du rendement, dispensant ainsi (MONÉGER, 1966, 1968*b*) de la décoloration préalable des pigments par la lumière ultraviolette (VARMA et CHICHESTER, 1962 ; COSTES, 1963*a*, 1965*a*, 1965*b*). Le comptage de chaque échantillon est prolongé le temps nécessaire pour que soit enregistré un nombre d'impulsions fixé à l'avance et limitant l'écart-type à 1 % au maximum du total compté, en admettant une loi de distribution gaussienne.

Les données qu'il a été possible de réunir par ces techniques sont rapportées ci-dessous. Puis, le dosage sur petites quantités ayant nécessité l'affinement des méthodes, la suite du travail comporte cette mise au point elle-même et les résultats qu'elle a permis d'obtenir.

II. LES PIGMENTS LIPOSOLUBLES DES FRONDES. INFLUENCE DES RÉSERVES GLUCIDIQUES ET DE LA DURÉE D'ÉCLAIREMENT

A. — ÉQUIPEMENT PIGMENTAIRE DES FRONDES

Les chlorophylles *a* et *b*, aisément séparables sur colonne de poudre de cellulose et identifiables, en solution dans l'acétone, par leur spectre d'absorption, sont représentées largement dans les frondes vertes (MONÉGER, 1965, 1968 *c*). Après saponification, la chromatographie sur cellulose de la liqueur éthéropétrolique obtenue sépare généralement 6 fractions (tableau II). Le comportement chromatographique

TABLEAU II

Caractéristiques spectrophotométriques des pigments de l'insaponifiable extrait des frondes de Spirodela polyrrhiza

∼ : inflexion ou plateau

Fractions	λ des maximums d'absorption en nm			Pigments
	Solvant d'élution	Ethanol	Sulfure de carbone	
1	475 — 448 — 427∼	—	507 — 481 — 457∼	β-carotène
2	471 — 442-448 — 425∼ 397	—	—	—
3	472 — 443 — 420	474 — 445 — 427 422∼	503 — 472 — 448∼	Lutéine
4	468,5 — 439,5 — 417	470 — 442 — 422∼	498 — 469 — 447∼	Epoxylutéine
5	469 — 439,5 — 417	470,5 — 441 — 418	498 — 467 — 440	Violaxanthine
6	466 — 437 — 413	466 — 437 — 413	493 — 462 — 436	Néoxanthine

(COSTES, 1958, 1963 *a*, 1965 *b*), les caractéristiques spectrophotométriques (GOODWIN et PHAGPOLNGARM, 1960 ; GOLDSMITH et KRINSKY, 1960 ; KRINSKY et GOLDSMITH, 1960 ; CHOLNOKY et *al.*, 1966 ; HAGER et MEYER-BERTENRATH, 1967 ; WEEDON, 1967) et les réactions avec H_2SO_4, HCl, HCOOH et $SbCl_3$ (KARRER et JUCKER, 1950 ; COSTES, 1965 *b*), ont permis de caractériser les constituants colorés de ces fractions (MONÉGER, 1965). La fraction 2, toutefois, est toujours assez faiblement représentée dans les extraits pour que son identité n'ait pas été recherchée : sa composition paraît d'ailleurs complexe et variable. La nature caroténoïdienne des produits qui la colorent n'est pas établie. Il pourrait s'agir de substances quinoniques (COSTES, 1963 *a*). La séquence courante des pigments chloroplastiques est donc qualitativement bien représentée dans les frondes normales de *Spirodela polyrrhiza*. Il faut noter cependant que la zéaxanthine, qui interfère avec la lutéine sur les colonnes de cellulose, n'a jamais été décelée, et que flavoxanthine et auroxanthine ne sont apparues que dans les toutes premières extractions. Il est probable qu'elles représentaient alors des artefacts. Ces informations étant recueillies, il reste à envisager l'aspect quantitatif de l'assortiment pigmentaire du matériel.

Les teneurs absolues et relatives des divers pigments liposolubles varient avec les conditions de culture. Dans les frondes normalement pigmentées, les teneurs globales en chlorophylles se situent aux environs de 7 mg/g de matière sèche. La chlorophylle *a* représente près de 70 % du total. Là somme des teneurs en caroténoïdes varie autour de 1 mg/g de matière sèche. Les premiers dosages ont fourni pour les pigments tétraterpéniques des valeurs légèrement inférieures (MONÉGER, 1965), imputables peut-être à des conditions de culture différentes, peut-être aussi à des dégradations encourues par les xanthophylles, et notamment par la lutéine, au cours des opérations de regroupement manuel des volumes fractionnés. Le β-carotène peut être plus (MONÉGER, 1965) ou moins (MONÉGER, 1966) abondant que la lutéine, selon l'origine et les conditions de traitement des échantillons. L'ordre de grandeur des teneurs observées atteste que la *Spirodela* ne s'écarte pas du cas général des feuilles d'Angiospermes.

Pour le matériel étiolé, on a dosé dans l'extrait global, sous le vocable très général de chlorophylle et d'une façon très approximative, les chlorophylles (formées en raison de l'éclairement très faible, mais quand même un peu efficace, qui préside aux opérations de renouvellement du milieu et de tri) et la protochlorophylle (MONÉGER, 1965). L'ensemble n'atteint pas 150 μg/g de matière sèche, soit 2 % de la teneur normale. L'examen spectrophotométrique d'un extrait brut a indiqué une teneur en caroténoïdes d'environ 80 μg/g de matériel étiolé sec. Afin de préciser la nature de ces substances, un volume important de matériel étiolé, fixé 2 semaines après sa germination, a été réuni : l'étude des caroténoïdes est ainsi possible en dépit des faibles teneurs. L'extrait, chromatographié sur cellulose après saponification, se sépare en 6 fractions et les tests de caractérisation donnent des résultats identiques à ceux obtenus avec le matériel vert. L'arsenal caroténoïdien des frondes étiolées ne diffère donc pas qualitativement de celui des frondes vertes. Mais les pigments, en particulier le β-carotène, sont beaucoup moins abondants. Le dosage effectué indique la présence, par gramme de matière sèche, de 10 μg de β-carotène, 70 μg de lutéine, 1 μg d'époxylutéine, 35 μg de violaxanthine et 5 μg de néoxanthine, soit au total 121 μg. La fraction 2 n'a pas été dosée.

B. — PARTICIPATION DES RÉSERVES GLUCIDIQUES TISSULAIRES A LA SYNTHÈSE DES CAROTÉNOIDES

Le végétal est-il capable d'engager dans les voies de la caroténoïdogenèse des chaînons carbonés issus de ses réserves glucidiques ? Telle est la première question posée. A défaut de pouvoir marquer électivement le matériel de réserve contenu dans le végétal sans rendre radioactifs, du même coup et préalablement à tout traitement, les caroténoïdes eux-mêmes, la méthode de dilution isotopique est la seule praticable (MONÉGER, 1966).

Le matériel expérimental est constitué par des clones de *Spirodela polyrrhiza* cultivés en cellule climatique (MONÉGER, 1968*b*), à une température de 22 °C et sous un éclairement de 6 000 lx. Les sujets d'expérience proviennent de cultures aseptiques entretenues en milieu stérile sur solution nutritive de PIRSON et SEIDEL (1950) additionnée de saccharose à la concentration de 10 g/l (KANDELER, 1962), tandis que les témoins sont issus de cultures réalisées sur milieu exclusivement minéral. Chaque échantillon, abondamment rincé à l'eau bidistillée, est placé dans un flacon à tare à couvercle rodé de 50 mm de diamètre, sur 20 ml de milieu minéral à pH 7,5 additionné de 0,89 mg de bicarbonate de sodium ^{14}C (C.E.A., 23,7 mCi/mM). Il est soumis pendant 160 mn, à la température de 22 °C, à un éclairement d'une intensité de 4 000 lx en lumière blanche, puis rincé de nouveau et fixé pour analyse.

Les résultats sont consignés dans le tableau III. Ils révèlent incontestablement, chez les sujets, une réduction sensible de l'incorporation du ^{14}C exogène dans les caroténoïdes (néoxanthine mise à part). Le ralentissement des dégradations de caroténoïdes, que les expériences de BANDURSKI (1949) ne permettaient pas d'écarter, ne saurait donc être ici seul en cause : il ne pourrait être invoqué qu'assorti d'une réduction de la vitesse de synthèse elle-même des polyènes colorés. Cette dernière est peu compatible avec l'accroissement de synthèse nette observé par cet auteur,

TABLEAU III

Incorporation à la lumière du carbone radioactif de $NaH^{14}CO_3$ dans les caroténoïdes de frondes de Spirodela polyrrhiza *préalablement cultivées sur milieu sucré*

Surface éclairée : 19,6 cm^2 - $NaH^{14}CO_3$: 250 μCi soit 12,5 μCi/ml.
S, sujets : matière fraîche 460 mg ; matière sèche 35,7 mg.
T, témoins : matière fraîche 334 mg ; matière sèche : 26,5 mg.

Pigments	Teneurs en μg/g de matière sèche		Radioactivités spécifiques en i.p.m./μg de pigment		Radioactivités incorporées				
					en i.p.m./mg de matière sèche		S/T en %	en % des caroténoïdes	
	S	T	S	T	S	T		S	T
β-carotène	466	431	26 600	45 700	12 400	19 400	63,9	74,0	68,6
Lutéine	347	485	5 800	11 900	2 000	5 600	35,7	11,9	19,8
Epoxylutéine	123	138	11 900	15 600	1 460	2 100	69,5	8,7	7,4
Violaxanthine	71	91	8 900	11 800	630	1 060	59,4	3,8	3,8
Néoxanthine	31	32	8 600	3 900	265	120	220,8	1,6	0,4
Total	1 038	1 177	—	—	16 755	28 280	59,2	100	100

ni avec l'importante stimulation de l'activité métabolique générale que paraît traduire la grande taille atteinte par les frondes cultivées sur milieu sucré. Il semble donc raisonnable d'admettre la participation, à la synthèse des tétraterpènes, de métabolites provenant du saccharose absorbé par les sujets préalablement à l'expérience, et mis en réserve dans leurs tissus. Les données présentées ici concernent des organismes chlorophylliens entiers, non soustraits à leur mode de vie habituel, sauf peut-être pour ce qui touche à la concentration en substances dissoutes et, par conséquent, aux caractéristiques osmotiques du milieu de culture. Interprétés avec l'appui des travaux antérieurs, qui se rapportent à des organes chlorophylliens fragmentés en survie (BANDURSKI, 1949), à des plantules étiolées (BEEKMANN, 1953, 1954) ou à des fruits séparés de la plante mère (PURCELL et THOMPSON, 1961), ils paraissent confirmer l'existence, au cours de l'élaboration des caroténoïdes, d'une compétition métabolique entre le carbone d'origine minérale et celui qui provient des réserves glucidiques constituées à partir d'éléments antérieurement puisés dans le milieu. Dans cette optique, les valeurs obtenues permettent d'évaluer à 40 % environ la participation, à la lumière, des réserves tissulaires aux synthèses de caroténoïdes rapportées à la masse de matière lyophilisée. Les résultats concernant la néoxanthine pourraient tenir aux difficultés particulières que présente sa purification (COSTES, 1963 *b*, 1965 *a*, 1965 *b*). Si tel n'est pas le cas, leur signification physiologique n'apparaît pas pour le moment. On peut noter l'égalité, chez les témoins, des radioactivités spécifiques de la violaxanthine et de la lutéine, et rappeler qu'un résultat semblable a été obtenu par BLASS et *al.* (1959) avec *Scenedesmus obliquus*.

Cette expérience apporte donc aux travaux précédents un indispensable complément : elle met en relief, par une méthode isotopique, l'importante contribution trophique que peuvent apporter, à la caroténoïdogenèse, les métabolites issus des processus respiratoires. Il est probable, pourtant, que, dans les conditions d'éclairement présentes, les chaînons carbonés fournis *in situ* par l'activité photosynthétique diluent sensiblement, par une compétition métabolique efficace, l'utilisation des autres matériaux disponibles. On pourrait donc s'attendre à observer, en l'absence de photosynthèse, une participation largement accrue de ces derniers aux synthèses caroténoïdiennes. Il paraît donc de plus en plus probable que l'incapacité de constituer un équipement caroténoïdien normal dans laquelle se trouvent, même lorsqu'ils disposent des réserves contenues dans l'organe de multiplication ou de reproduction qui leur a donné naissance, les végétaux étiolés, ne résulte pas uniquement d'une carence en matériel carboné. Elle reflète également une disharmonie dans la répartition de ce matériel entre les diverses activités métaboliques du végétal. Il est clair qu'une distribution équitable de ces réserves aux diverses fonctions organiques assurerait aux végétaux un aspect normal, malgré une croissance réduite si la nutrition est insuffisante. A ce stade, il était important d'observer le déroulement des phénomènes conduisant, à la faveur du verdissement des végétaux étiolés placés à la lumière, à l'établissement de potentialités normales, et aussi d'examiner dans quelle mesure la fourniture d'un excès de matériel organique carboné exogène au végétal étiolé maintenu à l'obscurité est susceptible de modifier les caractéristiques de son métabolisme caroténoïdien.

C. — INFLUENCE DE LA DURÉE D'ÉCLAIREMENT DES FRONDES ÉTIOLÉES SUR LA VITESSE D'INCORPORATION DU CARBONE MINÉRAL DANS LEURS CAROTÉNOIDES

Avant de livrer à l'expérimentation le matériel étiolé formé en présence de kinétine, il convenait de vérifier le maintien de ses potentialités caroténoïdogénétiques. Des turions, récoltés dans leur milieu naturel, ont été ensemencés sur milieu de HUTNER additionné de kinétine $3{,}3 \cdot 10^{-7}$ M, sous un éclairement blanc de 6 000 lx. Les frondes formées, fixées après 9 jours de culture dans ces conditions, accusent des teneurs en caroténoïdes inférieures à la normale. Mais, dans les frondes formées et maintenues pendant 30 jours à l'obscurité en présence de kinétine, puis soigneusement rincées, placées sur milieu normal à l'obscurité pendant 3 jours et illuminées, les teneurs en caroténoïdes, après 6 jours d'éclairement, ne diffèrent pas significativement de celles relevées dans les frondes formées à partir de turions à la lumière, en l'absence de kinétine, et fixées au bout de 6 jours. Moyennant ces précautions, la germination sur kinétine ne constitue donc pas un obstacle à l'expérimentation projetée.

L'expérience d'incorporation de bicarbonate ^{14}C de sodium est conduite avec de très petits échantillons comme si l'on disposait d'une méthode suffisamment sensible et précise pour permettre la séparation et le dosage des quelques μg de caroténoïdes présents dans les organes étiolés. Mais, au moment de l'extraction, du matériel vert lyophilisé provenant d'une culture unique est ajouté en quantité telle que la dilution de matière sèche soit la même pour tous les sujets d'expérience. Par cet artifice, on travaille sur une masse de caroténoïdes compatible avec les méthodes de dosage courantes. Il est ainsi possible d'évaluer la radioactivité incorporée

dans les caroténoïdes de chaque échantillon pendant les 2 h de séjour à la lumière sur substrat radioactif.

Les sujets et les témoins sont constitués par des lots d'environ 150 frondes étiolées, âgées de 7 semaines, obtenues à l'obscurité par germination à 22 °C et sur milieu de HUTNER additionné de kinétine 10^{-6} M, de turions d'un diamètre supérieur ou égal à 2 mm, récoltés dans le milieu naturel. Séparées du turion et rincées abondamment, les frondes sont réparties, au hasard, sur milieu de HUTNER dans des flacons à tare. Elles séjournent plusieurs jours à l'obscurité avant d'être traitées.

L'expérience consiste à faire subir aux sujets, avant de les placer sur précurseur radioactif, des éclairements de durées différentes. A la fin de cette période d'illumination préalable (respectivement 3 h, 20 h et 45 h), le $NaH^{14}CO_3$ (C.E.A., 23,7 mCi/mM) est ajouté en quantité représentant, pour les 20 ml de milieu de chaque flacon à tare, une radioactivité de 75 μCi, soit 3,75 μCi/ml, et l'éclairement est alors prolongé pendant 2 h. Puis le matériel est fixé. On peut constater que, si le verdissement est visible après 22 h d'éclairement, et très net après 47 h, les frondes n'ont cependant pas pris une coloration normale. Le poids final de matière sèche est de 14,7 mg pour les sujets 1 et 2 (5 h et 22 h d'éclairement préalable), et de 14,8 mg pour le sujet 3 (éclairé 47 h). Des témoins maintenus constamment à l'obscurité, et placés, pendant des temps homologues, sur milieu radioactif minéral sont également fixés. Les radioactivités incorporées, rapportées au mg de matière sèche de l'échantillon étiolé, sont regroupées dans le tableau IV. Les courbes de la figure 4 indiquent l'allure du phénomène.

TABLEAU IV

Radioactivités incorporées, en lumière blanche, à partir de $NaH^{14}CO_3$, dans les caroténoïdes de frondes étiolées, préalablement illuminées

t : 22 °C - Eclairement : 2 500 lx - Surface éclairée : 19,6 cm².
$NaH^{14}CO_3$: 75 μCi par flacon, soit 3,75 μCi/ml.
S_1, S_2, S_3 : sujets - T_1, T_2, T_3 : témoins correspondants.
M : matière sèche finale des échantillons étiolés, en mg.
E : durée d'éclairement préalable en heures (obscurité pour les témoins).
RI : radioactivité incorporée en i.p.m./mg de matière sèche étiolée.

Echantillons	S_1	T_1	S_2	T_2	S_3	T_3
E	3	3	20	20	45	45
M	14,7	15,1	14,7	14,6	14,8	17,8
RI β-carotène	784	10	2 145	13	2 154	20
RI Lutéine	46	14	271	5	236	5
RI Epoxylutéine	—	2	101	—	276	1
RI Violaxanthine	73	3	160	—	169	2
RI Néoxanthine	3	1	—	1	224	1

La fixation de carbone minéral, par une réaction de carboxylation indépendante de la photosynthèse (GOODWIN, 1958 *b*), semble se confirmer chez les témoins maintenus à l'obscurité, mais sa contribution aux synthèses caroténoïdiennes apparaît ici extrêmement limitée. Par contre, le ^{14}C d'origine photosynthétique y joue un rôle important. Il est intégré beaucoup plus rapidement dans le β-carotène que dans

les xanthophylles : la lutéine par exemple l'incorpore près de 10 fois moins vite que le β-carotène. COSTES (1965 *b*) a trouvé dans la feuille verte de Tomate un phénomène semblable. BILLOT et LEROY (1960) l'avaient déjà mis en évidence, avec des feuilles étiolées de Haricot qu'ils excisaient avant de les soumettre, en présence de $^{14}CO_2$ gazeux, à un éclairement très intense (20 000 lx), succédant à une préillumination de 4 000 lx. Les résultats présents, obtenus avec un matériel vivant dans des conditions normales, confirment les leurs sur ce point. Ils en diffèrent notablement en

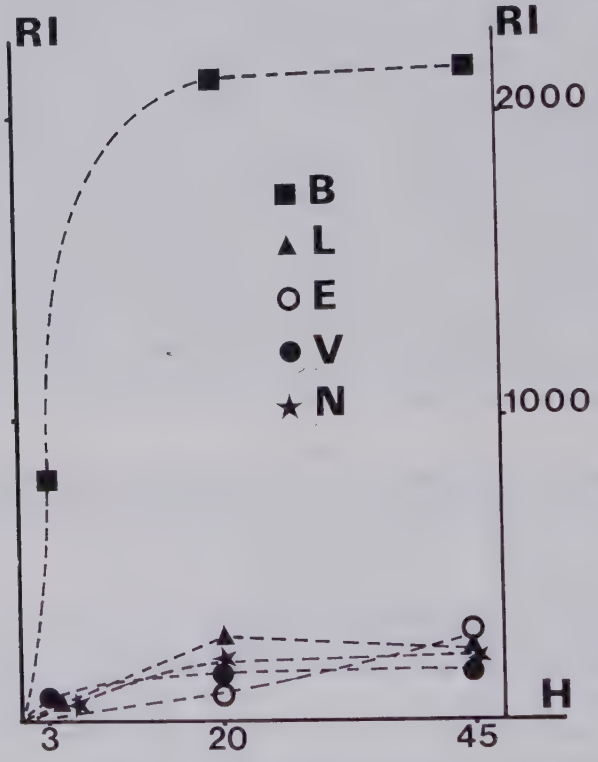

FIG. 4. — Incorporation de ^{14}C à partir de bicarbonate, dans les caroténoïdes de frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*, préalablement éclairées pendant les temps indiqués. Incubation à la lumière pendant 2 h ; *B* : β-carotène ; *L* : lutéine ; *E* : époxylutéine ; *V* : violaxanthine ; *N* : néoxanthine ; *RI* : radioactivité incorporée en i.p.m./mg de matière lyophilisée ; *H* : durée de préillumination, en heures.

montrant que les synthèses du β-carotène et des xanthophylles adoptent, à peu près en même temps, un régime stationnaire qui s'installe après 20 h d'éclairement environ pour le β-carotène, la lutéine et la néoxanthine, plus précocement pour la violaxanthine, et en tout cas bien avant le terme de la période de verdissement, c'est-à-dire bien avant l'installation d'une vitesse normale de fixation photosynthétique du CO_2. La disponibilité des chaînons d'origine photosynthétique, qui est en cours d'accroissement au moment où intervient cette stabilisation de la caroténoïdogenèse, semble donc ne pas être le seul phénomène contrôlant la vitesse de synthèse des caroténoïdes. La stabilisation observée pourrait traduire la mise en équilibre d'un système lié à la photosynthèse, mais agissant par un moyen catalytique, et par conséquent,

distinct de l'aspect trophique quantitatif de l'activité photosynthétique. Dans les résultats de BILLOT et LEROY, cette stabilisation n'apparaît pas pour le β-carotène, mais elle paraît s'établir très précocement pour la lutéine ainsi que pour la fraction, probablement composite, désignée sous le vocable d'époxydes.

La *Spirodela polyrrhiza* étiolée présente donc l'avantage d'offrir à l'examen, lorsqu'elle est portée à la lumière, 2 phases bien distinctes : une période d'accélération de synthèse (plus longue pour les xanthophylles, et plus courte, pour le β-carotène, que chez les végétaux utilisés par BILLOT et LEROY) qui s'étend sur les 20 premières heures d'éclairement, et une période d'approximative stabilité au cours de laquelle les synthèses paraissent se dérouler, au moins pendant 15 h, parallèlement et à une vitesse sensiblement régulière (sauf pour l'époxylutéine). Ce fait se prête bien à des expériences visant à comparer, sans crainte de voir plusieurs phénomènes superposer leurs effets, les vitesses de synthèse des différents pigments mesurées même après un traitement lumineux quelque peu prolongé. De plus, cette expérience fait apparaître de manière séparée les comportements des xanthophylles autres que la lutéine.

Les courbes que cette technique de transition a permis d'établir ne sont donc pas dépourvues de signification originale. Elles seront d'une grande utilité dans l'interprétation des expériences ultérieures. Cependant, par une telle méthode, il n'est possible de procéder ni au dosage des pigments, ni, par conséquent, au calcul de leurs radioactivités spécifiques. C'est pour pallier l'existence de ces limites, et pour pouvoir ainsi pousser plus avant l'exploration du problème physiologique posé, qu'une microméthode permettant d'isoler et de doser directement les caroténoïdes des très petits échantillons de frondes étiolées a été mise au point (MONÉGER, 1968 *a*).

III. MÉTHODE DE MICRODOSAGE DES PIGMENTS DANS LES PETITS ÉCHANTILLONS DE FRONDES ÉTIOLÉES

En raison de la fragilité des caroténoïdes, une méthode destinée au dosage de quantités infimes (souvent inférieures au μg) de ces substances doit faire une large place, non seulement à la sensibilité et à la précision des appareils de mesure mis en œuvre, mais d'abord et surtout aux précautions susceptibles d'une part, de conférer aux comparaisons d'échantillons le maximum de signification, d'autre part de préserver l'intégrité des pigments. Ces trois soucis permanents ont guidé la conception et la réalisation des expériences ainsi que la construction de l'équipement.

A. — AMÉLIORATION DE LA QUALITÉ DES EXTRAITS SOUMIS A L'ANALYSE

1. Réduction de la variabilité interéchantillons

La constitution des lots, qui comportent chacun 200 individus environ, pris au hasard dans une population génétiquement homogène, représente en elle-même une garantie : étant donné la taille statistique de l'échantillonnage, le résultat obtenu prend valeur, sans aucun doute, de moyenne représentative. Mais il faut également

réduire le plus possible la variabilité que peuvent introduire les facteurs de l'environnement. C'est à cette fin qu'ont été construites des enceintes climatiques qui assurent la rigueur maximale dans le contrôle des conditions de formation et de germination des turions dont le matériel expérimental est issu (MONÉGER, 1968 *b*).

2. Préservation de l'intégrité des pigments

De multiples facteurs d'altération sont susceptibles d'agir sur les caroténoïdes : enzymes, oxygène, lumière, chaleur et acides sont les plus importants. Le matériel à analyser est mis à l'abri de ces agents dès sa fixation. La lyophilisation à l'obscurité est une parade contre d'éventuelles activités enzymatiques résiduelles, et aussi contre les effets de la chaleur, de l'oxygène et de la lumière (MONÉGER, 1968 *b*).

Par une ventilation et une climatisation efficaces des locaux, par l'usage de solvants préalablement refroidis et par la multiplication des rinçages et des vérifications de toutes sortes, le maximum de garanties contre d'éventuelles pertes, dégradations, ou altérations des pigments en solution est assuré aux opérations nécessitant l'intervention manuelle. Mais surtout, leur nombre a été considérablement réduit. L'ensemble des équipements conçus pour conduire de façon indépendante, au froid, à l'abri de l'oxygène et autant que possible de la lumière, les opérations de broyage, d'évaporation à sec, de reprise sous azote, de chromatographie et de dosage a fait l'objet d'une description détaillée (MONÉGER, 1968 *b*). La chromatographie sur papier (MONÉGER, 1956, 1957) est abandonnée au profit de la chromatographie sur colonne codifiée par COSTES (1958).

B. — ACCROISSEMENT DE SENSIBILITÉ ET DE PRÉCISION DES DISPOSITIFS ANALYTIQUES

1. Réalisation d'un chromatospectrophotomètre autonome et ultrasensible

L'appareillage qui a été construit est capable d'assurer, au sein d'une cabine totalement obscure et réfrigérée par un groupe compresseur G_R (fig. 5), l'intégralité des opérations de séparation et de dosage des caroténoïdes. Introduit dans le tube récepteur D, l'extrait éthéropétrolique, propulsé par la micropompe P, est chromatographié par voie ascendante sur colonne de poudre de cellulose C, puis divisé par

FIG. 5. — Dispositif autonome de dosage des extraits caroténoïdiens.
A : embout en téflon ; C : colonne de verre ; C_1 : microcuve à circulation ; D : tube récepteur ; F, F_2 : plateau et bloc de commande du fractionneur automatique ; G : garniture de téflon ; G_R : groupe frigorifique ; H : robinet ; J : fiole à solvant ; M : potentiomètre enregistreur ; N : rodage normalisé interchangeable ; O : tube de verre ; P : micropompe ; R, R_2 : relais ; S : spectrophotomètre à double faisceau ; S_i : siphon ; S_t : stabilisateur de tension électrique ; S_u : tubulure d'amenée sur la colonne ; T, T_2 : thermistances ; U : tube collecteur ; V : vanne électromagnétique.

FIG. 6. — Reproduction photographique du chromatogramme enregistré lors de l'analyse d'un extrait contenant 0,63 µg de β-carotène, 2,24 µg de lutéine, 0,13 µg d'époxylutéine, 1,35 µg de violaxanthine, 0,24 µg de néoxanthine. Les premiers et les derniers enregistrements, séparés par une durée de fonctionnement de 6 h environ, sont représentés à un fort grossissement pour montrer la stabilité du dispositif photométrique. Les enregistrements correspondant à l'époxylutéine attestent l'acuité de la séparation.

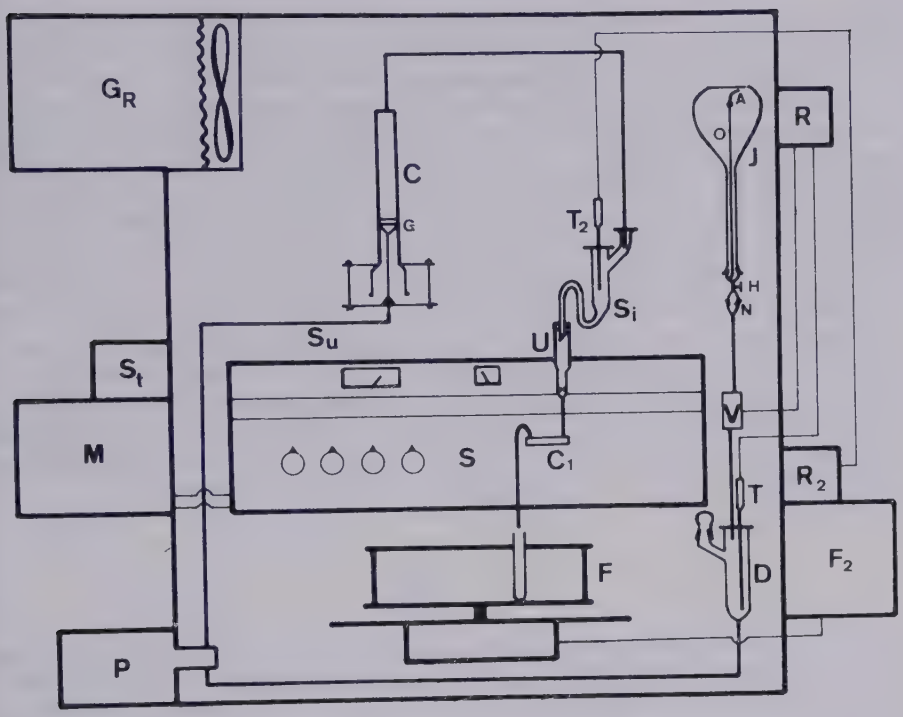
G_R
C
G
T_2
S_i
A
O
J
R
H
N
S_u
U
S_t
M
S
C_1
V
T
R_2
F
D
F_2
P

FIG. 5.

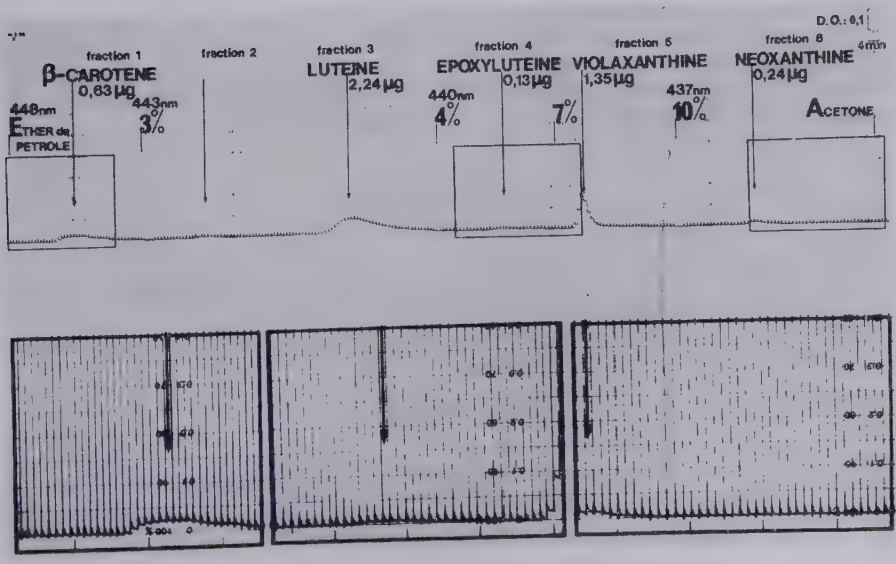
D.O.: 6,1
4 mm
fraction 1
β-CAROTENE
0,63 µg
448nm
443nm
3%
ETHER de PETROLE
fraction 2
fraction 3
LUTEINE
2,24 µg
fraction 4
EPOXYLUTEINE
0,13µg
440nm
4%
7%
fraction 5
VIOLAXANTHINE
1,35µg
437nm
10%
fraction 6
NEOXANTHINE
0,24 µg
ACETONE

FIG. 6.

le siphon S_i (COSTES, 1958) en fractions d'égal volume. Ces dernières, déversées dans le tube U et dosées au passage dans la cuve C_1 du spectrophotomètre S, sont recueillies par le collecteur F que commande, au moyen du relais R_2 et du bloc électrique F_2, la thermistance T_2. La seule intervention nécessaire consiste donc à échanger, au moment voulu, l'ampoule J qui fournit à la demande, grâce à la vanne électromagnétique V, à la thermistance T et au relais R, le solvant d'élution. Cette opération est rapidement conduite grâce au dispositif adaptateur N muni d'un robinet H. L'entrée d'air dans la fiole, par le tube O et son prolongement en téflon A, permet l'écoulement du liquide. Le potentiomètre M, équipé d'une stabilisation à 2 étages S_t, enregistre la densité optique. La garniture d'étanchéité G de la colonne chromatographique C et les tubulures S_u sont en téflon, matériau inerte à nos solvants.

L'appareil sépare les caroténoïdes et les décèle dans l'éluat jusqu'à des concentrations sensiblement inférieures à 0,005 μg/ml. Ces performances exceptionnelles tiennent à l'importance du trajet optique qu'offre la cuve spectrophotométrique à circulation de 50 mm de long C_1, et au soin que nous avons apporté à la stabilisation du signal photométrique (fig. 6). La concentration C_i de chaque siphonnat est donnée, en fonction de sa densité optique D_i, par la relation :

$$C_i = \frac{D_i}{EL}$$

où E est l'absorption spécifique maximale, sous 1 cm et à la concentration de 1 mg/l (1 μg/ml), du pigment considéré, en solution dans le solvant d'élution et L, le trajet optique des microcuves (cuve à circulation C_1 et cuve de référence). E est exprimé en l mg^{-1} cm^{-1}, et L en cm. Son contenu pigmentaire a pour masse, si V est, en ml, le volume délivré par le siphon :

$$m_i = C_i V = \frac{V}{EL} D_i$$

La masse de pigment constituant une fraction caroténoïdienne est égale à la somme des contenus des siphonnats déversés pendant son élution :

$$M = \Sigma m_i = \Sigma \frac{V}{EL} D_i$$

Le facteur $K_f = \dfrac{V}{EL}$ dépend seulement, une fois fixées les caractéristiques du siphon et des microcuves, de la nature du pigment présent dans l'éluat. Le dosage se ramène donc au calcul de :

$$M = K_f \Sigma D_i$$

Pour chaque pigment susceptible d'être présent dans les extraits, la valeur du paramètre K_f a été déterminée (tableau V) ainsi que les longueurs d'onde et les absorptions spécifiques au niveau des pics présentés dans le solvant d'élution. Grâce à la mise au point de cet appareillage, le dosage de quantités de pigments inférieures au μg conserve une bonne précision (MONÉGER, 1968 *a*).

TABLEAU V

Etalonnage du dispositif de microdosage des caroténoïdes.

E : absorption spécifique maximale dans le solvant d'élution, en l/mg · cm.
λ_m : longueur d'onde du maximum d'absorption du pigment en solution dans l'éluant, en nm.
K_f : paramètre multiplicatif du dispositif de dosage.

Fractions	Pigment constituant	Solvant d'élution	λ_m	E	K_f
1	β-carotène	Ether de pétrole	448	0,263	1,95
2	—	Ether de pétrole + Acétone (97/3)	—	—	—
3	Lutéine	Ether de pétrole + Acétone (97/3)	443	0,255	2,01
4	Epoxylutéine	Ether de pétrole + Acétone (96/4)	440	0,316	1,62
5	Violaxanthine	Ether de pétrole + Acétone (93/7)	440	0,242	2,12
6	Néoxanthine	Ether de pétrole + Acétone (90/10)	437	0,227	2,26

2. Simplification de la préparation des solutions à soumettre au comptage de radioactivité

Ainsi séparés, dosés et collectés sans subir de manipulation, les pigments correspondant à la zone centrale d'élution des fractions colorées marquées par un isotope sont purifiés, comme il a été dit, en vue du comptage de radioactivité.

Le solvant de dosage (éther de pétrole pour les carotènes, éthanol pour les xanthophylles) dans lequel les caroténoïdes sont généralement transférés (COSTES, 1965 *b*) à partir de l'éluant spécifique utilisé au cours de la purification entraîne,

TABLEAU VI

Caractéristiques spectrophotométriques des caroténoïdes en solution dans les solvants de comptage en scintillation liquide

λ maximums : longueurs d'onde des maximums d'absorption des pigments dissous dans le solvant indiqué, en nm.
E : absorption spécifique maximale des pigments dissous dans le solvant indiqué, en ml/μg · cm.
∼ : inflexion ou plateau.

Pigments	Solvant	λ maximums	E
β-carotène	Toluène	490-462-440 ∼	0,231
Lutéine	Benzène	485-456-430	0,236
Epoxylutéine	Toluène	481-452-429	0,278
Violaxanthine	Toluène	481-451-427	0,218
Néoxanthine	Toluène	476-447-421	0,196

s'il est introduit dans les fioles de comptage, une chute sensible du rendement. Il a paru avantageux d'effectuer les dosages directement dans un des solvants à faible pouvoir extincteur recommandés pour la scintillation liquide. C'est dans ce but qu'ont été déterminées la position des maximums d'absorption et la valeur de l'absorption spécifique maximale présentées par chaque pigment lorsqu'il se trouve en solution dans un tel solvant (tableau VI). Pour la lutéine, le benzène, moins couramment utilisé que le toluène, a été choisi parce qu'il se trouve être le solvant d'élution utilisé lors de la purification sur $CaCO_3$. Le β-carotène purifié sur alumine activée et les fractions 4, 5 et 6, repris sous azote dans le toluène, ainsi que la lutéine, obtenue pure en solution dans le benzène, sont dosés dans des cuves spectrophotométriques spéciales qui offrent un trajet optique de 40 mm pour un volume utile inférieur à 2 ml et qui confèrent donc au dosage une excellente précision même pour les pigments faiblement représentés. Une quantité connue (inférieure ou égale à 4 ml) de solution dosée est ensuite directement introduite dans la fiole, puis additionnée de 8 ml de solution scintillante, préparée en dissolvant 4 g de 2,5-Diphényloxazole ou DPO et 0,1 g de 1,4-bis-2-(4-Méthyl-5-Phényloxazolyl)-Benzène ou diméthyl-POPOP, pour 1 l de toluène, Merck, pour analyse. Le contenu de la fiole est alors éventuellement complété à 12 ml par du toluène pur, puis soumis au comptage. Cette simplification technique va dans le sens général de la réduction du nombre des manipulations à faire subir aux caroténoïdes pendant l'analyse. L'ensemble de la méthode qui vient d'être brièvement décrite procure la possibilité de doser les caroténoïdes dans des échantillons très réduits de frondes étiolées (Monéger, 1968 *a*, 1968 *b*), et par conséquent de mener à bien la suite de l'expérimentation.

IV. APPLICATION : ACTION DU SUCRE EXOGÈNE SUR LES TENEURS EN CAROTÉNOIDES DES FRONDES ÉTIOLÉES

Grâce à de telles possibilités de dosage, l'évolution des teneurs en caroténoïdes au cours de la croissance à l'obscurité des frondes formées par germination de turions et l'influence éventuelle des sucres exogènes sur cette évolution ont été examinées.

Kay et Phinney (1956) ont montré que les teneurs en caroténoïdes, dans les germinations de Maïs étiolées, passent par un maximum 8 jours après le semis. On a vérifié que les caroténoïdes de *Spirodela polyrrhiza* présentent un type d'évolution analogue (tableau VII). Il y a lieu de tenir compte de cette constatation dans l'interprétation des résultats, ces derniers pouvant être fonction de l'âge des frondes.

Par ailleurs, des turions formés en culture aseptique, sur milieu saccharosé, ont été ensemencés à l'obscurité, les uns sur milieu autoclavé contenant du saccharose, les autres sur milieu minéral. La comparaison des teneurs en caroténoïdes des frondes formées dans les deux cas (tableau VIII) indique que la présence de saccharose peut accélérer quelque peu l'évolution du contenu caroténoïdien, mais qu'elle est loin de permettre aux frondes la réalisation d'une pigmentation normale. Cette cinétique sommaire invite à la prudence dans l'interprétation des comparaisons entre 2 échantillons de même âge placés, l'un sur milieu sucré, l'autre sur solution minérale, les différences constatées n'impliquant pas forcément l'inégalité des maximums atteints.

On peut par suite admettre, au moins provisoirement, que les produits issus du matériel glucidique disponible au niveau cellulaire prennent part massivement à la

TABLEAU VII

Evolution des teneurs en caroténoïdes et chlorophylle de frondes étiolées de Spirodela polyrrhiza *issues de turions de grande taille et se développant à l'obscurité*

Milieu : solution de Hutner, additionnée de kinétine (10^{-6} M).
N : nombre de jours après l'ensemencement.
Teneurs en caroténoïdes en µg/g de matière sèche.

N	10	21	40
β-carotène	—	29	27
Lutéine	—	132	128
Epoxylutéine	—	14	8
Violaxanthine	—	87	33
Néoxanthine	—	1	8
Caroténoïdes totaux	86	263	204
Chlorophylle	133	—	165

TABLEAU VIII

Teneurs en caroténoïdes de frondes étiolées se développant à l'obscurité sur solutions nutritives saccharosées ou non

Kinétine : 10^{-6} M.
N : nombre de jours après l'ensemencement.
Teneurs en caroténoïdes, en µg/g de matière sèche.

Solution nutritive	Avec saccharose		Sans saccharose	
N	16	34	20	34
β-carotène	11	13	15	15
Lutéine	65	48	72	62
Epoxylutéine	1	2	1	5
Violaxanthine	34	28	29	32
Néoxanthine	3	4	2	3
Total	114	95	119	121

synthèse des caroténoïdes. Mais, l'importance de cette participation paraît ne pas dépendre uniquement de la quantité de précurseurs disponible. Même en présence d'un excès de ces derniers, leur utilisation se trouve, si les végétaux ne sont pas éclairés, limitée à un niveau très inférieur à celui qui est atteint à la lumière. Cette vitesse limite d'incorporation des chaînons carbonés dans les caroténoïdes paraît atteinte, chez les sujets verdissant à la lumière, alors que l'intensité de la fixation

photosynthétique du CO_2 n'est pas encore parvenue à son maximum. Elle n'est pas franchie malgré l'accroissement ultérieur du rythme de production des précurseurs d'origine photosynthétique. Elle ne semble donc pas imputable à une limitation quantitative de matière première disponible. Chez les végétaux maintenus à l'obscurité, l'évolution vers cette limite pourrait être accélérée par la présence de matériaux glucidiques exogènes, sans que son niveau maximal s'en trouvât relevé (contrairement à ce qu'auraient pu laisser croire des dosages de comparaison effectués sur des sujets de même âge). Ce niveau est strictement lié, évidemment, au rythme de formation des précurseurs d'origine photosynthétique lorsque celui-ci est suffisamment faible pour jouer le rôle de facteur trophique limitant. Mais il semble par ailleurs, en présence de quantités non limitantes de matériel glucidique disponible, se trouver sous la dépendance d'un autre mécanisme de contrôle. C'est vers la recherche d'indications concernant la nature de ce dernier que sont orientées les expériences suivantes.

L'analyse des effets qualitatifs de la lumière peut apporter des indications dans ce domaine. Dans une série d'expériences, le matériel étiolé est exposé à des radiations oligochromatiques, en présence de précurseurs minéraux ou organiques marqués par le ^{14}C. Les différences précédemment observées entre les comportements des divers caroténoïdes lors de l'illumination des frondes étiolées conduisent à étudier séparément l'incorporation de l'isotope dans chacun des caroténoïdes présents ; c'est la première tentative visant à établir les caractéristiques qualitatives de l'action de la lumière non plus seulement sur la teneur, mais encore sur la vitesse de synthèse elle-même de chacun des pigments.

V. SPECTRE D'ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LA VITESSE D'INCORPORATION DU ^{14}C MINÉRAL DANS LES CAROTÉNOIDES DES FRONDES ÉTIOLÉES

Les échantillons ont été préparés selon le protocole précédemment indiqué. Les frondes étiolées utilisées sont âgées de 16 jours : elles se trouvent donc dans la phase d'accroissement des teneurs pigmentaires (tableau VII) qui garantit une production active et donc bien observable de caroténoïdes. De plus, elles sont placées, au moyen d'un éclairement préalable de 63 h, en régime stabilisé de synthèse, afin que le décalage entre l'installation de la caroténoïdogenèse maximale et l'accession du végétal à sa pleine capacité d'intensité photosynthétique soit nettement manifesté. Après cette préillumination aux longueurs d'onde indiquées (fig. 7) et à 25 °C, le précurseur radioactif (bicarbonate ^{14}C de sodium, C.E.A., 24,7 mCi/mM, 50 μCi pour 25 ml de milieu de HUTNER par flacon à tare, soit 2 μCi/ml) est ajouté et l'éclairement oligochromatique est prolongé pendant 2 h. Compte tenu de la lumière transmise et de l'énergie absorbée par les couvercles des flacons, l'éclairement représente sensiblement 4,6 n Einstein cm^{-2} s^{-1}. Le poids de matière sèche des échantillons est compris entre 18 et 19 mg.

Leurs teneurs en caroténoïdes se répartissent suivant un spectre voisin de celui de l'incorporation totale de ^{14}C (fixation essentiellement photosynthétique, ainsi qu'il a été montré antérieurement : tableau IV) trouvée dans cette expérience (fig. 7, 8 et 9). Ce spectre rappelle également le spectre d'absorption établi *in vivo* sur le même matériel par une méthode qui a été décrite (JACQUES, 1968). CLAES (1967) a montré chez un mutant de *Chlorella vulgaris* un type d'accumulation semblable, interprété en liaison avec la cyclisation des polyènes. Dans les expériences présentes, l'influence de la lumière se manifeste le plus nettement sur les pigments les mieux représentés. Mais le phénomène est général : les teneurs tétraterpéniques paraissent

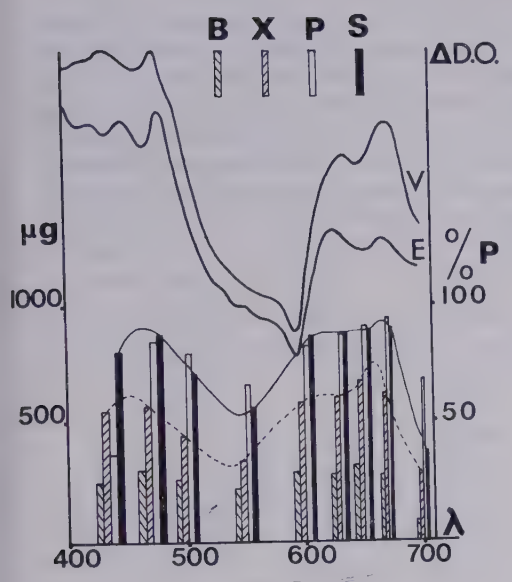

FIG. 7.

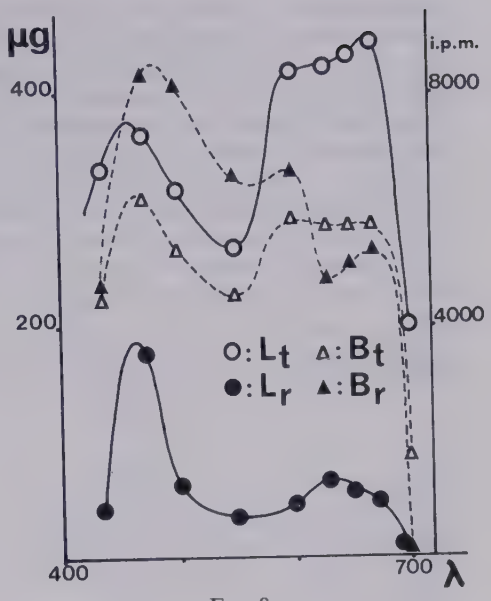

FIG. 8.

FIG. 7. — Spectre d'absorption *in vivo* et spectres d'action de la lumière sur l'accumulation des caroténoïdes et la fixation de CO_2, dans les frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*. *B* : teneur en β-carotène, en µg/g de matière sèche finale ; *E* : spectre d'absorption *in vivo* des frondes étiolées en début d'expérience, en Δ D.O. ; *P* : fixation du carbone fourni sous forme de bicarbonate (en % de la quantité offerte) ; *S* : somme des teneurs en caroténoïdes, en µg/g de substance sèche ; *V* : spectre d'absorption *in vivo* des frondes verdissantes en fin d'expérience, en Δ D.O. ; *X* : teneur en xanthophylles, en µg/g de matière sèche ; λ : longueurs d'onde en nm ; échantillon : 200 frondes ; éclairement : durée totale 65 h (dont 2 h avec $NaH^{14}CO_3$), énergie 4,6 n Einstein cm^{-2} s^{-1} ; matière sèche : 19 mg environ ; on a représenté l'allure du spectre pour l'ensemble des caroténoïdes (en trait plein) et la somme des xanthophylles (en pointillé) ; la largeur affectée à la colonne représentative est sensiblement proportionnelle à la bande passante.

FIG. 8. — Incorporation de $^{14}CO_2$ dans les caroténoïdes : action prolongée de radiations oligochromatiques sur la teneur et le marquage du β-carotène et de la lutéine dans les frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*. B_r : radioactivité incorporée dans le β-carotène pendant l'expérience, en i.p.m./g de matériel sec ; B_t : teneur en β-carotène, en µg/g de tissus secs ; L_r : radioactivité incorporée dans la lutéine pendant le traitement, en i.p.m./g de matériel sec ; L_t : teneur en lutéine, en µg/g de matière sèche finale ; λ : longueurs d'onde, en nm ; conditions expérimentales comme pour la figure 7 ; on a représenté l'allure possible des spectres en pointillé pour le β-carotène, en trait plein pour la lutéine.

donc étroitement liées à l'intensité de la fixation d'énergie lumineuse par les pigments chlorophylliens.

Les spectres d'action sur l'incorporation de ^{14}C dans les caroténoïdes se présentent sous un jour tout différent, les radiations rouges se révélant peu efficaces (fig. 8 et 10). Cette discordance inattendue, retrouvée ultérieurement, entre les vitesses d'incorporation du carbone minéral dans les pigments et le taux d'accumulation de ces derniers, souligne l'intérêt de l'étude des vitesses de synthèse plutôt que des synthèses nettes. Ces dernières peuvent en effet masquer des indications fondamentales. Ainsi, au stade d'évolution atteint par les étioplastes après 63 h d'éclairement oligochromatique intense, la qualité de la lumière se traduit de façon très

différente dans la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes. Les deux phénomènes paraissent donc dépendre de deux mécanismes distincts : il se confirme que la vitesse maximale de caroténoïdogenèse n'est pas contrôlée (sauf en conditions limitantes) par l'intensité de la fixation photosynthétique du carbone minéral, et qu'elle se démarque nettement de l'accumulation. Les énergies élevées reçues par les échantillons paraissent exclure un mécanisme lié au développement plastidial par l'intermédiaire de la lumière bleue (HENNINGSEN, 1967), car elles atteignent probablement le niveau de saturation au bout d'un temps très court. D'ailleurs, l'accumulation préférentielle constatée en lumière rouge permet d'écarter l'idée d'un retard initial intervenu sous éclairement de grande longueur d'onde. S'il s'avère que cet écart ne traduit pas une influence de la qualité de la lumière sur la dégradation des pigments,

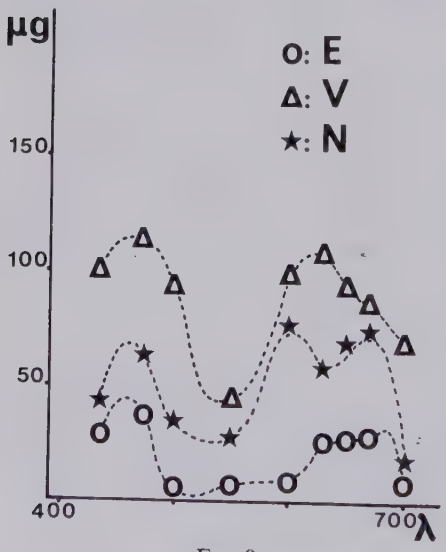

FIG. 9.

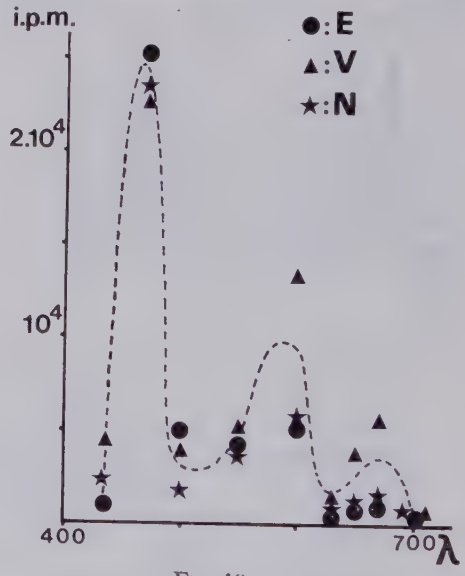

FIG. 10.

FIG. 9. — Action prolongée de radiations oligochromatiques sur les teneurs en époxylutéine, violaxanthine et néoxanthine des feuilles étiolées de *Spirodela polyrrhiza*.
Conditions expérimentales comme pour la figure 7.
E : époxylutéine ; *V* : violaxanthine ; *N* : néoxanthine ; teneurs en µg/g de matière sèche finale ; λ : longueurs d'onde, en nm ; l'allure possible des spectres est esquissée en pointillé.

FIG. 10. — Action de radiations oligochromatiques sur les radioactivités incorporées à partir de $NaH^{14}CO_3$ dans les caroténoïdes époxydés des frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*.
Conditions expérimentales comme pour la figure 7.
E : époxylutéine ; *V* : violaxanthine ; *N* : néoxanthine ; radioactivités en i. p. m · /g de matière sèche finale ; λ : longueurs d'onde, en nm ; l'allure possible des spectres est esquissée en pointillé.

on devra conclure à un effet cinétique : dans les plantules étiolées de Maïs, TREHARNE (1964) a mis en évidence une chute marquée de l'incorporation de $^{14}CO_2$ dans le β-carotène, après la 36e heure d'illumination. D'une manière analogue, dans l'expérience décrite ici, l'accumulation du pigment non marqué pendant les heures de préillumination est probablement suivie, après la stabilisation déjà mise en évidence, d'un net ralentissement survenant plus tôt en lumière rouge qu'en lumière bleue, selon le spectre d'action de la lumière sur l'activité photosynthétique.

Cette expérience, comme les précédentes, met en évidence l'existence d'un contrôle lumineux exercé sur la synthèse des caroténoïdes par le canal de l'activité photosynthétique, mais indépendant de l'intensité de la fixation proprement dite du carbone minéral par la photosynthèse. On est donc tout naturellement conduit à envisager que l'intervention de l'activité photosynthétique puisse mettre en jeu un mécanisme propre à la partie photochimique de ce phénomène. En tout cas, l'aspect cinétique du problème laisse entrevoir d'intéressantes observations. C'est pourquoi l'expérience suivante comporte un temps d'illumination sensiblement plus réduit.

VI. SPECTRE D'ACTION DE LA LUMIÈRE SUR L'INCORPORATION DU ^{14}C FOURNI SOUS FORME D'ACÉTATE DANS LES CAROTÉNOIDES DES FRONDES ÉTIOLÉES

Après avoir été incubées à l'obscurité pendant 12 h à 24 °C, sur du milieu de HUTNER additionné d'acétate 2-^{14}C de sodium (C.E.A., 34 mCi/mM, 40 μCi pour 20 ml par flacon, soit 2 μCi/ml), les frondes, semaines, reçoivent pendant 2 h 30 un éclairement oligochromatique de longueur d'onde indiquée (fig. 11 et 12) correspondant à 1,3 n Einstein $cm^{-2}\ s^{-1}$. L'acétate ^{14}C âgées de deux ne leur est pas retiré pendant l'illumination, afin que les quantités disponibles pour la caroténoïdogenèse restent aussi constantes que possible.

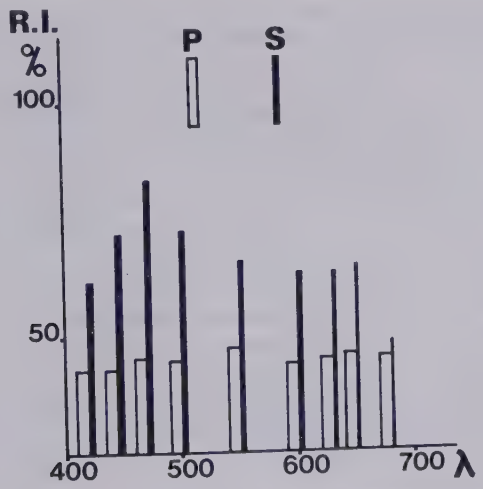

FIG. 11. — Absorption d'acétate marqué au ^{14}C par les frondes étiolées, avant (*P*) et après (*S*) irradiation par la lumière oligochromatique de longueur d'onde indiquée.
Eclairement : durée, 2 h 30, énergie, 1,3 n Einstein $cm^{-2}\ s^{-1}$.
RI : radioactivité incorporée, en % de la quantité offerte ; λ : longueur d'onde, en nm.

Alors que l'incorporation totale de radioactivité dans les frondes est, avant l'éclairement, sensiblement la même pour tous les échantillons, elle se répartit, après l'éclairement, suivant un spectre qui présente un pic important dans le bleu (fig. 11) et qui rappelle de près le spectre obtenu pour la « dispersion des vésicules » au cours du développement plastidial (HENNINGSEN, 1967). L'ordre de grandeur des énergies lumineuses

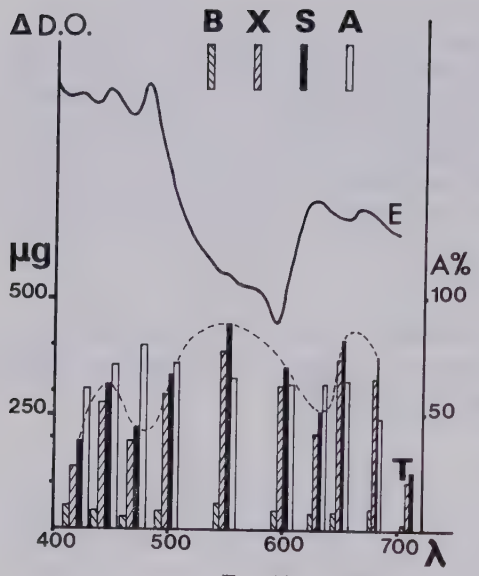

FIG. 12

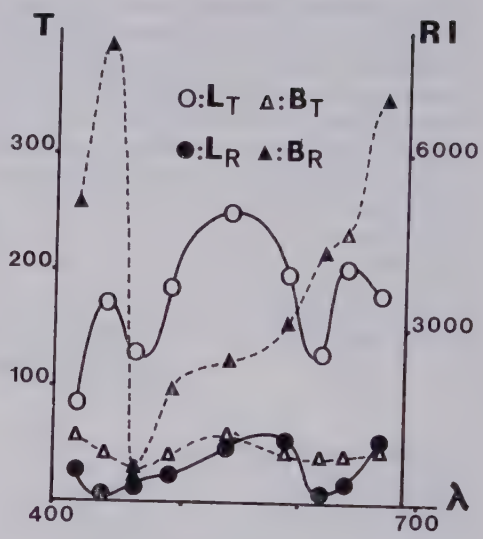

FIG. 13

FIG. 12. — Action d'éclairements oligochromatiques brefs sur les teneurs en caroténoïdes et sur l'incorporation d'acétate 2-^{14}C dans les frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*.

A : absorption d'acétate 2-^{14}C, en % de la quantité offerte ; *B* : teneurs en β-carotène, en µg/g de matière sèche finale ; *E* : spectre d'absorption *in vivo* des sujets au début de l'expérience ; *S* : somme des teneurs en caroténoïdes en µg/g de matière sèche finale ; *T* : témoins à l'obscurité ; *X* : somme des teneurs en xanthophylles, en µg/g de matière sèche finale ; λ : longueurs d'onde en nm ; échantillons : lots de 200 frondes ; éclairement : durée, 2 h 30, énergie, 1,3 n Einstein $cm^{-2}s^{-1}$; incubation à l'obscurité : 12 h ; matière sèche : 15 mg environ ; l'allure possible du spectre est représentée en pointillé pour les caroténoïdes totaux ; la largeur affectée à la colonne représentative est sensiblement proportionnelle à la bande passante.

FIG. 13. — Incorporation d'acétate 2-^{14}C : action de lumières oligochromatiques de courte durée sur la teneur etle marquage du β-carotène et de la lutéine dans les frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*. Conditions expérimentales comme pour la figure 12.

B_R : radioactivité incorporée dans le β-carotène ; B_T : teneur en β-carotène, en µg/g de matière sèche finale ; L_R : radioactivité incorporée dans la lutéine ; L_T : teneur en lutéine, en µg/g de matière sèche finale ; *RI* : radioactivité incorporée pour 15 mg de matière sèche, en i.p.m. ; *T* : teneurs ; λ : longueurs d'onde, en nm ; le tracé possible du spectre est représenté en pointillé pour le β-carotène, en trait plein pour la lutéine.

n'exclut pas que les deux phénomènes soient liés. Le spectre d'action sur l'accumulation des caroténoïdes présente un aspect singulier, avec un maximum important couvrant le domaine de la lumière verte, et deux pics étroits et faibles dans le bleu et le rouge (fig. 12, 13 et 14). La synthèse préférentielle dans le vert, constatée ici chez les frondes jeunes, ne se retrouve pas avec des frondes de 30 jours, qui ont probablement épuisé leurs réserves. Par contre, elle se manifeste dans les frondes âgées de 80 jours et qui sont donc engagées dans la voie du catabolisme prédominant. WHITMORE (1960) a observé un phénomène semblable pour les carotènes, mais dans des conditions expérimentales très différentes (matériel non étiolé). Les résultats ne sont donc pas comparables. La répartition des radioactivités incorporées présente

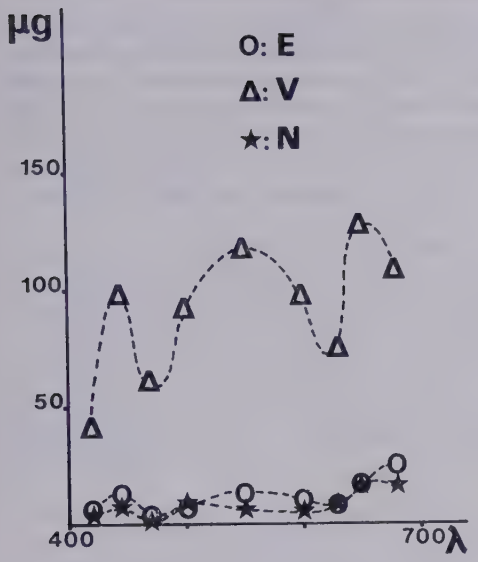

FIG. 14

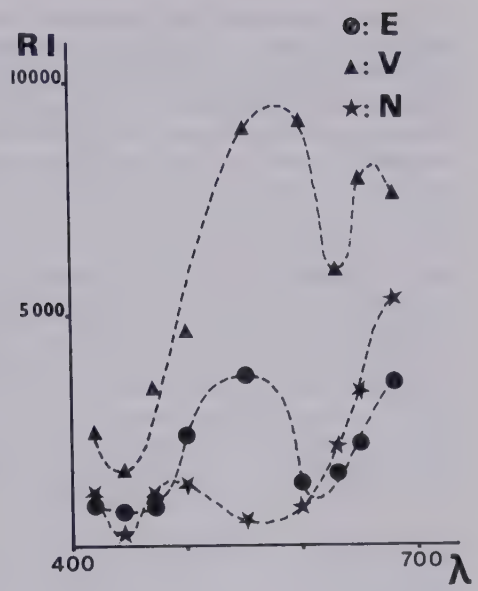

FIG. 15

FIG. 14. — Action de lumières oligochromatiques de courte durée sur les teneurs en époxylutéine, violaxanthine et néoxanthine des frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*.
Conditions expérimentales comme pour la figure 12.
E : teneurs en époxylutéine, en µg/g de matière sèche ;
V : teneurs en violaxanthine, en µg/g de matière sèche ;
N : teneurs en néoxanthine, en µg/g de matière sèche ;
λ : longueurs d'onde, en nm ; les tracés en pointillé esquissent l'allure possible des spectres.

FIG. 15. — Action de lumières oligochromatiques de courte durée sur l'incorporation d'acétate 2-^{14}C dans les caroténoïdes époxydés des frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*.
Conditions expérimentales comme pour la figure 12.
RI : radioactivité incorporée par 15 mg de matière sèche, en i.p.m., dans l'époxylutéine (*E*), la violaxanthine (*V*) et la néoxanthine (*N*) ; λ : longueurs d'onde, en nm ; l'allure générale possible des spectres est indiquée en pointillé.

également, notamment pour la lutéine, l'époxylutéine et la violaxanthine (fig. 13 et 15), un maximum dans le vert tandis qu'on observe une chute marquée de l'incorporation de ^{14}C aux longueurs d'onde des maximums secondaires du spectre d'accumulation. Le phénomène est moins net pour la néoxanthine (fig. 15) et surtout pour le β-carotène (fig. 13). Ces courbes suggèrent que, grâce à l'effet catalytique de la lumière, le végétal est capable, au début de l'éclairement, d'utiliser pour la synthèse de ses caroténoïdes le matériel précurseur accumulé à l'obscurité. Mais ceci n'est possible que dans les zones du spectre où la lumière ne suscite pas une autre consommation prioritaire des précurseurs disponibles. GABRIELSEN et *al.* (1961) ont observé, durant les 25 premières minutes d'irradiation, une formation de CO_2 et une consommation d'oxygène. C'est donc seulement dans le vert, où la photosynthèse est moins active et les matériaux de réserve moins mis à contribution, que ces derniers ne sont pas limitants et peuvent être orientés vers la synthèse des caroténoïdes. Lorsque la photosynthèse devient rentable pour le végétal, par suite

de l'amortissement de la consommation initiale des chaînons carbonés nécessaires à l'ensemble des processus de développement des étioplastes, la synthèse de caroténoïdes s'accélère dans le bleu et le rouge, au niveau des pics qui représentent l'amorce d'une accumulation prépondérante mise en évidence dans ces domaines du spectre par l'expérience précédente. Mais elle se fait alors essentiellement à partir de matériel formé sur place par fixation photosynthétique et réduction du CO_2 non marqué de l'atmosphère. La répartition des radioactivités incorporées à partir de l'acétate (fig. 13 et 15), précurseur organique disponible avant le début de l'éclairement et accumulé par les tissus, milite en faveur de cette interprétation : pour la lutéine, l'époxylutéine et la violaxanthine, les pics secondaires d'accumulation correspondent en effet aux minimums d'incorporation et traduisent donc bien une synthèse de caroténoïdes à partir du carbone non radioactif de l'atmosphère, le pic dans le vert correspondant au contraire à une forte incorporation d'acétate marqué. Le comportement du β-carotène est différent. Il pourrait s'expliquer par un déroulement plus rapide des phénomènes à son niveau. En raison de sa haute réactivité aux stimulus photochimiques (qui a déjà été mise en évidence, et qui n'est pas surprenante si l'on observe qu'en retour, c'est lui qui accuse le plus nettement les conséquences de l'étiolement), le β-carotène est activement synthétisé dès le début de l'éclairement, sans subir l'effet de privation de précurseur marqué qui se manifeste pour les xanthophylles. Peut-être même y contribue-t-il pour une part importante. La différence marquée entre le comportement du β-carotène et celui des xanthophylles se trouve ainsi de nouveau soulignée. Le mécanisme qu'elle traduit pose un problème intéressant. En tout cas, l'acétate est incorporé intensément dans les molécules de β-carotène aux longueurs d'onde du bleu et du rouge qui correspondent aux maximums de fixation d'énergie par les pigments chlorophylliens.

Cette expérience a donc pour effet de dissocier une fois de plus les deux aspects du contrôle exercé par la lumière sur la synthèse des caroténoïdes. Ce contrôle paraît s'exercer par la voie de l'absorption photosynthétique d'énergie, mais il comporte d'une part le mécanisme trophique de production des précurseurs carbonés, d'autre part l'aspect catalytique présidant à l'introduction de ces chaînons dans le matériel caroténoïdien. Les expériences qui vont suivre sont destinées à cerner de plus près la nature du mécanisme non trophique de contrôle lumineux de la caroténoïdogenèse.

VII. EFFET DE LA PUROMYCINE SUR LES VITESSES DE SYNTHÈSE ET L'ACCUMULATION A L'OBSCURITÉ DES CAROTÉNOIDES DANS LES FRONDES ÉTIOLÉES

Les effets oligodynamiques produits par l'énergie lumineuse fixée dans les mécanismes photochimiques de la fonction chlorophyllienne mettent-ils en jeu la synthèse d'une protéine enzymatique impliquée dans le métabolisme des caroténoïdes ? Se réduisent-ils à la transformation d'une telle protéine ? Consistent-ils en une production de cofacteurs actifs, ou bien en l'installation entre eux d'un équilibre favorable ? Les possibilités de caroténoïdogenèse à l'obscurité manifestées par les germinations étiolées non séparées de la plante mère, particulièrement accusées pour les plantules de Gymnospermes (Wieckowski et Goodwin, 1967), suggèrent l'intervention d'un facteur fourni par l'organe de réserve à la jeune plante privée

de lumière : capable de pallier l'absence d'éclairement, il serait donc le produit actif par lequel ou sur lequel s'exercerait son action. La transmissibilité de ce facteur militerait plutôt en faveur de la 3e des hypothèses énoncées plus haut. Dans ce cas, les produits concernés pourraient être des substances spécifiques aux voies de la biosynthèse caroténoïdienne, ou bien concourir à de multiples réactions métaboliques. L'effet de la puromycine sur l'incorporation à l'obscurité de carbone marqué d'origine exogène dans les caroténoïdes des frondes étiolées, apporte quelques indications dans ce domaine.

Des frondes étiolées, âgées de 20 jours, sont placées pendant 24 h sur 25 ml de solution de PIRSON et SEIDEL (1950) additionnée d'acétate (0,18 mg) et de bicarbonate (0,70 mg) de sodium, puis pendant 18 h 15 sur le même milieu comportant en plus de la puromycine 10^{-3} M (aminonucléoside N.B.C.). Elles sont ensuite transférées sur un milieu de PIRSON et SEIDEL, additionné de puromycine 10^{-3} M, de biarbonate ^{14}C de sodium (C.E.A., 23,0 mCi/mM, 50 µCi pour 10 ml, soit 5 µCi/ml) et d'acétate de sodium 2-^{14}C (C.E.A., 8,8 mCi/mM, 50 µCi pour 10 ml, soit 5 µCi/ml). Pendant toutes ces opérations, l'obscurité n'a été interrompue que le temps minimal indispensable et par une lumière verte extrêmement faible. Après un séjour de 4 h à l'obscurité au contact des précurseurs marqués, les frondes sont fixées pour analyse. Des frondes témoins sont cultivées en même temps en l'absence de puromycine, toutes les autres conditions étant les mêmes.

Le résultat obtenu est spectaculaire (tableau IX). Tandis que l'incorporation totale de ^{14}C (carboxylations et métabolisation de l'acétate), rapportée à 20 mg de matière sèche, est sensiblement réduite en présence de puromycine, l'incorporation dans les caroténoïdes et leur accumulation sont fortement accrues. Il faut noter que les radioactivités incorporées, traduisant la vitesse de la synthèse proprement dite des caroténoïdes (puisqu'elles sont proportionnelles au nombre de molécules formées

TABLEAU IX

Incorporation à l'obscurité de carbone radioactif dans les caroténoïdes de frondes de Spirodela polyrrhiza *traitées par la puromycine (aminonucléoside)* 10^{-3} *M*

Séjour sur puromycine avant incubation sur précurseurs marqués : 18 h 15.
S, sujet : matière sèche 20,2 mg — *T*, témoin : matière sèche 18,8 mg.
$NaH^{14}CO_3$: 50 µCi soit 5 µCi/ml — Acétate-2-^{14}C : 50 µCi soit 5 µCi/ml.
Radioactivité totale incorporée rapportée à 20 mg de matière sèche.
S = 57 446 800 i.p.m. — *T* = 97 137 800 i.p.m.

Pigments	Teneurs en µg/g de matière sèche		Radioactivités spécifiques en i.p.m./µg de pigment		Radioactivités incorporées en i.p.m./mg de matière sèche		*S/T*	en % des caroténoïdes		en % de la radioactivité totale incorporée × 10^{-4}	
	S	*T*	*S*	*T*	*S*	*T*		*S*	*T*	*S*	*T*
β-carotène	18	7	15 800	5 600	5 800	800	7	51,6	63,7	100	8,2
Lutéine	84	27	43	39	70	20	3	0,6	1,6	1	0,2
Epoxylutéine	7	1	19 600	8 100	2 900	180	16	25,7	14,4	51	18,5
Violaxanthine ..	22	21	2 700	470	1 180	195	6	10,5	15,5	21	2,0
Néoxanthine	8	3	8 500	1 030	1 300	60	22	11,6	4,8	23	0,6
Total	139	59	—	—	11 250	1 255	9	100,0	100,0	196	29,5

pendant le temps de l'expérience) diffèrent beaucoup plus notablement que les radioactivités spécifiques, ce qui reflète une dilution différente par les pigments formés antérieurement à l'addition de précurseurs marqués. En d'autres termes, les quantités de pigments accumulées chez les sujets et chez les témoins avant l'introduction de l'isotope dans le milieu nutritif étaient déjà différentes.

La puromycine est un antibiotique qui inhibe spécifiquement, mais réversiblement, les synthèses protéiques en s'opposant au transfert sur les ribosomes. Elle inhibe par exemple la synthèse d'anthocyanes induite par l'intermédiaire du phytochrome, montrant ainsi que le photorécepteur agit dans ce cas par le biais des synthèses protéiques (Mohr, 1966). L'expérience présente propose une alternative : ou bien la stimulation de la caroténoïdosynthèse consiste en une dérepression enzymatique, ou bien elle ne met pas en jeu de formation d'enzyme et au contraire, le blocage de nombreuses synthèses protéiques et des réactions métaboliques qui en dépendent exalte la synthèse des tétraterpènes, comme si un facteur cessait alors d'être consommé et se trouvait ainsi disponible pour la synthèse des caroténoïdes. L'action de l'hydroxylamine (Bandurski, 1949) plaide en faveur de la deuxième éventualité et les expériences précédentes avec le saccharose montrent qu'un tel facteur ne saurait être d'ordre trophique.

Son double rôle de stimulation, puis de limitation de la vitesse de synthèse des caroténoïdes évoque fortement le déplacement d'un équilibre. Celui-ci jouerait sur une substance oligodynamique probablement non protéique, et son niveau à l'obscurité ne serait pas le même qu'à la lumière. Un tel type de substances produites sous forme réduite par les mécanismes respiratoires aussi bien que par l'activité photosynthétique, mais en proportions différentes, estre présenté par les nucléotides oxydoréducteurs NAD et NADP. Ces coenzymes donnent une idée du modèle sur lequel le phénomène pourrait se dérouler. Ils entrent en jeu l'un et l'autre dans les oxydations respiratoires et dans la photosynthèse, mais c'est le premier d'entre eux qui se trouve préférentiellement réduit au cours des dégradations cellulaires, tandis que c'est essentiellement le second qui intervient dans les photoréductions. On pourrait donc concevoir que le niveau de nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate réduit disponible dans les chloroplastes pour les réactions de la caroténoïdogenèse soit plus élevé, et par conséquent que la synthèse des tétraterpènes soit plus active à la lumière qu'à l'obscurité. Ces considérations sont à rapprocher de l'exaltation du pouvoir photoréducteur que l'étiolement produit dans les plastes (Phung-Nhu-Hung, 1968), et du rôle attribué aux caroténoïdes dans les photoréductions (Lundegårdh, 1968) : le mécanisme envisagé pourrait correspondre à un phénomène d'adaptation.

L'intervention du NADP réduit est nécessaire à la formation de mévalonate à partir d'acétate (Ferguson et *al.*, 1959 ; Popjak et Cornforth, 1960). Dans l'hypothèse d'une ségrégation confinant au chloroplaste les enzymes spécifiques de la caroténoïdogenèse (Goodwin et Mercer, 1963), la lumière n'interviendrait pas seulement en fournissant par photosynthèse du mévalonate *in situ*, mais encore en apportant, sous forme de photoréducteur, une quantité supplémentaire de NADP réduit et en permettant ainsi l'utilisation accrue des produits extrachloroplastiques dérivés du matériel de réserve. A l'obscurité, le NADP réduit serait capté au passage, et consommé préférentiellement, dans les zones cellulaires les plus proches des sites les plus actifs des dégradations respiratoires. Cette consommation préférentielle étant inhibée par la puromycine, les disponibilités pour la synthèse des pigments seraient accrues jusqu'à un nouvel état d'équilibre.

VIII. ACQUISITION A LA LUMIÈRE DE LA CAPACITÉ D'UTILISER L'ACÉTATE EXOGÈNE POUR LA SYNTHÈSE DES CAROTÉNOIDES DANS LES FRONDES ÉTIOLÉES

Des frondes étiolées âgées de 26 jours séjournent pendant le temps habituel à l'obscurité sur milieu minéral après séparation du turion. Elles sont ensuite placées à l'obscurité pendant 24 h sur un milieu contenant de l'acétate de sodium (0,93 mg pour 10 ml de milieu par flacon à tare). Puis elles reçoivent un éclairement de 2 500 lx pendant des temps différents suivant les échantillons : 1 h 05 pour le numéro 1, 3 h 10 pour le numéro 2, 8 h 25 pour le numéro 3 et 22 h 25 pour le numéro 4. Après quoi les frondes sont transférées pour un traitement de 16 h à l'obscurité sur un milieu contenant de l'acétate marqué au ^{14}C (C.E.A., 8,8 mCi/mM, 100 μCi pour 10 ml de milieu par flacon à tare, soit 10 μCi/ml). Elles sont enfin fixées pour analyse.

Les résultats montrent que les teneurs (fig. 16 et 17) restent, malgré le séjour prolongé à l'obscurité, plus élevées chez les plantes plus longuement éclairées.

Les incorporations de ^{14}C dans la lutéine indiquent une stimulation de l'utilisation d'acétate exogène sous l'effet de l'éclairement. Cette stimulation croît avec la durée d'illumination,

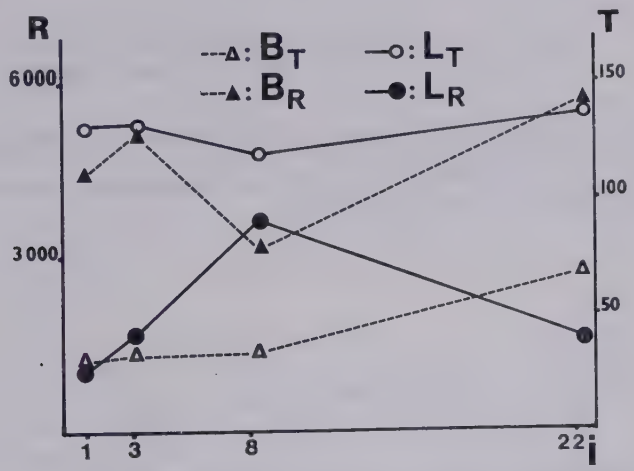

FIG. 16 — Influence du temps de préillumination sur les teneurs et le marquage à l'obscurité par l'acétate 2-^{14}C du β-carotène et de la lutéine dans les frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*. *T* : teneurs en β-carotène (B_T) et en lutéine (L_T), en μg/g de matière sèche finale ; *R* : radioactivités, en i.p.m., rapportées à 10 mg de matière sèche, incorporées dans le β-carotène (B_R) et la lutéine (L_R) ; *I* : durée de préillumination en heures.

jusqu'à un maximum atteint après 8 h environ, puis décroît, peut-être en raison de la formation, devenue alors notable, de précurseurs non marqués d'origine photosynthétique dans les chloroplastes. Le CO_2 marqué produit par la respiration présente en effet une radioactivité spécifique relativement faible.

Les autres xanthophylles se comportent de façon analogue (fig. 18), mais le *β*-carotène manifeste, ici encore, une réactivité plus grande (fig. 16). Il est possible que son évolution soit une image accélérée de celle des autres caroténoïdes qui paraissent réagir plus lentement. Les expériences précédentes avaient déjà fait apparaître des différences sensibles entre le carotène et les caroténols.

Le modèle d'explication impliquant l'élévation photochimique du rapport des formes réduite et oxydée du NADP doit être aménagé, le niveau élevé de ce rapport ne se maintenant pas plus de quelques minutes après la fin de l'éclairement. Un modèle faisant intervenir un accroissement à la lumière du rapport NADP/NAD est plus plausible, mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour préciser plus avant le mécanisme du phénomène mis en évidence dans ces recherches.

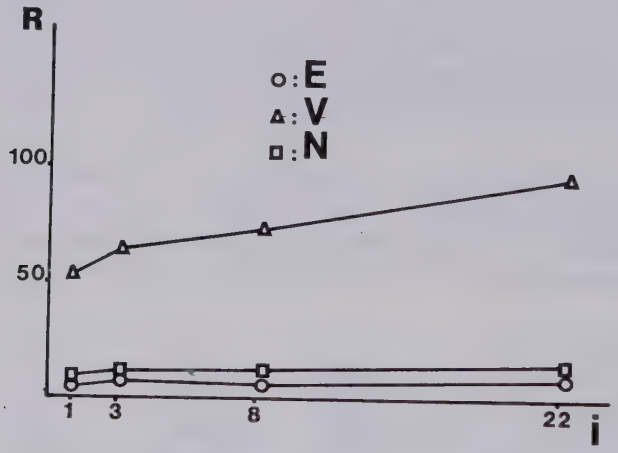

FIG. 17. — Influence du temps de préillumination sur les teneurs des xanthophylles époxydées dans les frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*.
R : teneurs en µg/g de matière sèche finale ; *I* : durée de préillumination en heures ; *E* : époxylutéine ; *V* : violaxanthine ; *N* : néoxanthine.

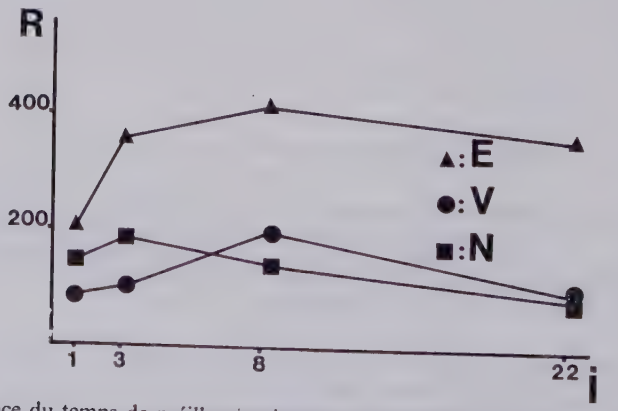

FIG. 18. — Influence du temps de préillumination sur l'incorporation à l'obscurité d'acétate 2-^{14}C dans les xanthophylles époxydées des frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza*.
R : radioactivités incorporées, en i.p.m., par 10 mg de frondes ; *I* : temps de préillumination en heures ; *E* : époxylutéine ; *V* : violaxanthine ; *N* : néoxanthine.

CONCLUSIONS

Il ne faut évidemment pas perdre de vue que le matériel végétal utilisé a subi au début de son développement l'action de la kinétine. D'éventuels effets résiduels de ce traitement, bien qu'ils soient peu probables, comme le montre l'expérience préliminaire simple qui a été décrite, ne peuvent être totalement exclus. Mais leur intervention, si elle est susceptible de modifier le degré du phénomène, ne paraît pas pouvoir en altérer la nature. Les résultats obtenus ne sont-ils pas limités au matériel végétal particulier utilisé dans ces expériences ? De nouveaux travaux sont nécessaires pour apporter une réponse catégorique à cette question. Mais il paraît douteux que la *Spirodela* puisse manifester une originalité à ce point marquée.

D'autres photorécepteurs que la chlorophylle sont-ils impliqués dans le phénomène ? Les spectres d'action établis ne présentent pas d'indice simple invitant à ouvrir ce débat. Cependant, le phytochrome peut influer sur les teneurs en caroténoïdes des végétaux étiolés (Cohen et Goodwin, 1962 ; Henshall et Goodwin, 1964 ; Virgin, 1966, 1967 ; Schnarrenberger et Mohr, 1967), et dans l'optique d'universalité que tendent à lui conférer les spéculations formulées à propos de son mode d'action (Hartmann, 1966 ; Wagner et Mohr, 1966), des expériences spécialement orientées en ce sens seraient nécessaires pour trancher. Mais le phytochrome paraît agir sur la mobilisation des réserves alors que le phénomène étudié ici met en cause leur utilisation proprement dite et superpose ses effets à ceux de la préirradiation forcée reçue par les frondes lors du tri et de la répartition. De plus il n'a pas été observé de phénomène d'induction, et la fixation des frondes aussitôt après le traitement lumineux écarte les phénomènes intervenant après un temps de latence. L'effet de la lumière qui vient d'être mis en évidence est donc peut-être précédé ou même conditionné par d'autres, mais son individualité propre ne peut être mise en doute. Il représente un aspect nouveau de l'intervention de la lumière dans le métabolisme des caroténoïdes.

Comment expliquer les différences entre le comportement du carotène et celui des xanthophylles ? A quel niveau des voies biosynthétiques ce contrôle intervient-il, et peut-on mettre en évidence à l'obscurité l'accumulation d'un précurseur ? Quels sont les rapports avec le contrôle lumineux des caroténoïdosynthèses chez les organismes non chlorophylliens (Batra, 1967) ? L'effet de la puromycine et celui de la lumière sont-ils additifs ? Pour résoudre ces problèmes, des expériences portant sur des plastes isolés doivent être entreprises. En effet, dans les frondes intactes, les phénomènes consommateurs d'acétate marqué qui se déroulent dans les cellules hors des plastes réduisent les quantités de précurseur mises à la disposition des synthèses plastidiales. Il masquent ainsi ou perturbent certains effets des traitements lumineux ou physicochimiques. L'étude des plastes isolés devrait permettre de cerner de plus près le détail intime des phénomènes.

Les buts initialement assignés à ce travail sont atteints. Sur le plan méthodologique, la miniaturisation des techniques, en permettant l'analyse précise des caroténoïdes dans les échantillons très réduits de matériel étiolé ouvre des possibilités nouvelles de recherche. Sur le plan physiologique, l'étude des spectres d'action de la lumière sur les vitesses de synthèse des caroténoïdes, et non plus seulement sur leurs teneurs, révèle des faits inattendus. Les données présentées ici montrent que l'aspect photochimique des synthèses caroténoïdiennes ne se limite pas au rôle

trophique évident joué par la fourniture photosynthétique de la matière première organique nécessaire. L'éclairement exerce en effet sur la caroténoïdogenèse un contrôle étroit de nature oligodynamique, et bien que ce second mécanisme mette en jeu la fixation d'énergie lumineuse par les pigments chlorophylliens, ses effets ont été dissociés expérimentalement de ceux du premier. Ils s'exercent au niveau de l'utilisation des précurseurs issus soit du métabolisme photosynthétique, soit du métabolisme respiratoire. JOLCHINE (1962) a observé à la lumière une incorporation accrue du ^{14}C de l'acétate dans les caroténoïdes et acides gras chloroplastiques des feuilles de *Bryophyllum*. COSTES (1965*b*) a montré que, dans les feuilles vertes, la lumière favorise l'incorporation de l'acétate dans les caroténoïdes. Il en va de même dans le matériel étiolé. Et les résultats obtenus suggèrent l'intervention de cofacteurs impliqués dans les synthèses caroténoïdiennes. Ce contrôle responsable à la fois de la stimulation et de la limitation de vitesse des synthèses caroténoïdiennes fait penser que les niveaux d'équilibre atteints par ces cofacteurs à la lumière et à l'obscurité sont différents. Le phénomène pourrait se dérouler sur le modèle de l'équilibre NADP/NAD variant selon que les dégradations respiratoires fonctionnent seules ou associées aux mécanismes photosynthétiques. De nouvelles expériences devront éprouver cette hypothèse de travail et préciser si l'intervention de la lumière se limite aux réactions photochimiques actuellement connues dans la photosynthèse, ou bien si elle intéresse également un autre mécanisme du métabolisme des caroténoïdes.

REMERCIEMENTS

Ces recherches ont été menées avec la collaboration technique très appréciée de Mlle Yvette MICHANOL, Technicienne à la Faculté des Sciences de Paris.

J'exprime ma gratitude à MM. les Professeurs L. PLANTEFOL, P. CHOUARD, R. ULRICH et A. MOYSE pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à mon travail. Que toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation veuillent bien trouver ici mes remerciements très vifs.

BIBLIOGRAPHIE

ARNON D.I., 1949. – Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxydase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.

BANDURSKI R.S., 1949. – Synthesis of carotenoid pigments in detached bean leaves. *Bot. Gaz.*, **111**, 95-109.

BARRENSCHEEN H.K., PANY J. et SRB E., 1942. – Die Bildung von Ascorbinsaüre und der Carotenoide in etiolierten Weizenkeimlingen. *Biochem. Z.*, **310**, 285-291.

BATRA P.P., 1967. – Mechanism of photoinduced carotenoid synthesis. Induction of carotenoid synthesis by antimycin A in the absence of light in *Mycobacterium marinum*. *J. biol. Chem.*, **242**, 5630-5635.

BEEKMANN H., 1953. – Über den Umsatz von Carotinoiden in höheren Pflanzen. *Naturwiss.*, **40**, 486-487.

BEEKMANN H., 1954. – Untersuchungen über den Umsatz von Carotinoiden in höheren Pflanzen. *Z. Bot.*, **42**, 387-435.

BILLOT J. et LEROY C., 1960. – Sur la genèse des pigments et l'activité photosynthétique des feuilles étiolées de *Phaseolus vulgaris* au cours du verdissement. *Rev. gén. Bot.*, **67**, 477-521.

BLAAUW-JANSEN G., KOMEN J.G. et THOMAS J.B., 1950. – On the relation between the formation of assimilatory pigments and the rate of photosynthesis in etiolated oat seedlings. *Biochim. Biophys. Acta*, **5**, 179-185.

BLASS U., ANDERSON J.M. et CALVIN M., 1959. – Biosynthesis and possible functional relationships among the carotenoids, and between chlorophyll A and chlorophyll B. *Plant Physiol.*, **34**, 329-333.

BOARDMAN N.K., 1966. – Protochlorophyll. In *The Chlorophylls*, L.P. Vernon et G.R. Seely éd., Academic Press, New York et Londres, 437-480.

BOGORAD L., 1965. – Chlorophyll biosynthesis. In *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, T.W. Goodwin éd., Academic Press, Londres et New York, 29-74.

BRAITHWAITE G.D. et GOODWIN T.W., 1957. – Biosynthesis of β-carotene from DL-β-hydroxy-β-methyl-5-(2-^{14}C) valerolactone by *Phycomyces blakesleanus* and carrot slices. *Biochem. J.*, **67**, 13-14.

CHAMPIGNY M.L., 1959. – Sur l'influence de l'intensité des différentes radiations lumineuses dans la photosynthèse de *Rhodosorus marinus* Geitler (Rhodophycée). *Rev. Cyt. Biol. vég.*, **21**, 1-43.

CHOLNOKY L., GYÖRGYFY K., SZABOLCS J., WEEDON B.C.L. et WAIGHT E.S., 1966. – Foliaxanthin. *Chem. Com.*, **13**, 404-405.

CLAES H., 1967. – Action spectrum of light-dependent carotenoid synthesis in *Chlorella vulgaris*. In *Biochemistry of chloroplasts*, Vol. II, T.W. Goodwin éd., Academic Press, Londres et New York, 441-444.

COHEN R.Z. et GOODWIN T.W., 1962. – The effect of red and far-red light on carotenoid synthesis by etiolated maize seedlings. *Phytochemistry*, **1**, 67-72.

COSTES C., 1958. – Séparation et dosage des caroténoïdes foliaires par chromatographie sur cellulose. *Ann. agron.*, sup. **1A**, 35-48.

COSTES C., 1962. – Action d'alcools diterpéniques sur la biosynthèse des caroténoïdes et du phytol à partir d'acétate ^{14}C-2 chez les plantules de Maïs. *C.R. Acad. Sci.*, **255**, 355-357.

COSTES C., 1963*a*. – Incorporation de $^{14}CO_2$, d'acétate 2-^{14}C et de mévalonate 2-^{14}C dans les caroténoïdes de la feuille adulte de Tomate. *Ann. Physiol. vég.*, **5**, 115-140.

COSTES C., 1963*b*. – Biosynthèse des caroténoïdes par les chloroplastes des feuilles de Maïs à partir de Phytofluène ^{14}C. *C.R. Acad. Sci.*, **256**, 3535-3537.

COSTES C., 1965*a*. – Métabolisme et rôle physiologique des caroténoïdes dans les feuilles vertes. *Ann. Physiol. vég.*, **7**, 105-142.

COSTES C., 1965*b*. – Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles. *Thèse Doct. (Etat) Sc. nat.*, Paris-Orsay.

CZOPEK M., 1963. – Studies on the external factors inducing the formation of turions in *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden. *Acta. Soc. bot. Pol.*, **32**, 199-211.

CZOPEK M., 1964. – The action of kinetin, gibberellic acid and red light on the germination of turions of *Spirodela polyrrhiza*. *Bull. Acad. Pol. Sc.*, **12**, 177-182.

DURANTON J., 1964. – Etude de la biogenèse et de la constitution des chloroplastes à l'aide des indicateurs radioactifs. *Physiol. Vég.*, **2**, 363-408.

DURANTON J., GALMICHE J.M. et ROUX E., 1958. – Métabolisme des pigments chlorophylliens chez le Tabac. *C.R. Acad. Sci.*, **257**, 3464-3467.

EULER (von) H. et HELLSTROM H., 1929. – Über die Bildung von Xanthophyll, Carotin, und Chlorophyll in belichteten und unbelichteten Gerstenkeimlingen. *Z. Physiol. Chem.*, **183**, 117-183.

FERGUSON J., DUER I. et RUDNEY H., 1959. – *Prod. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **45**, p. 499 : cité par BONNER J., 1965. – The isoprenoids. In *Plant Biochemistry*, Academic Press, Londres et New York, p. 670.

FRANK S. et KENNEY A.L., 1955. – Chlorophyll and carotenoid destruction in the absence of light in seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, **30**, 413-418.

GABRIELSEN E.K., MADSEN A. et VEJLBY K., 1961. – Induction of photosynthesis in etiolated leaves. *Physiol. Plant.*, **14**, 98-110.

GOLDSMITH T.H. et KRINSKY N.I., 1960. – The epoxyde nature of the carotenoid neoxanthin. *Nature*, **188**, 491-493.

GOODWIN T.W., 1952. – *The comparative biochemistry of the carotenoids*. Chapman and Hall Ltd, Londres.

GOODWIN T.W., 1958*a*. – Incorporation of $^{14}CO_2$, (2-^{14}C) acetate and (2-^{14}C) mevalonic acid into β-carotene in etiolated maize seedlings. *Biochem. J.*, **68**, 26 P-27 P.

GOODWIN T.W., 1958*b*. – Studies in carotenogenesis. XXV. The incorporation of $^{14}CO_2$, (2-^{14}C) acetate and (2-^{14}C) mevalonate into β-carotene by illuminated etiolated maize seedlings. *Biochem J.*, **70**, 612-617.

GOODWIN T.W., 1960. – Chemistry, biogenesis and physiology of the carotenoids. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Vol. V/1, W. Ruhland éd., Springer Verlag, Berlin, Göttingen et Heidelberg, 394-443.

GOODWIN T.W., 1965*a*. – The biosynthesis of carotenoids. In *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, T.W. Goodwin éd., Academic Press, Londres et New York, 143-173.

GOODWIN T.W., 1965*b*. – Regulation of terpenoid synthesis in higher plants. In *Biosynthetic pathways in higher plants*, J.B. Pridham et T. Swain éd., Academic Press, Londres et New York, 57-71.

GOODWIN T.W., 1967. – Terpenoids and chloroplast development. In *Biochemistry of chloroplasts*, Vol. II, T.W. Goodwin éd., Academic Press, Londres et New York, 721-733.

GOODWIN T.W. et MERCER E.I., 1963. – The regulation of sterol and carotenoid metabolism in germinating seedlings. In *The control of lipid metabolism, Biochem. Soc. Symp.*, Vol. XXIV, J.K. Grant éd., Academic Press, Londres et New York, p. 37. Cité par ROGERS L. J., SHAH S.P.J. et GOODWIN T.W. – In *Biochemistry of chloroplasts*, Vol. II, T.W. Goodwin éd., Academic Press, Londres et New York, 283.

GOODWIN T.W. et PHAGPOLNGARM S., 1960. – Studies in carotenogenesis. XXVIII. The effect of illumination on carotenoid synthesis in french bean *(Phaseolus vulgaris)* seedlings. *Biochem. J.*, **76**, 197-199.

GORHAM P.R., 1950. – Heterotrophic nutrition of seed plants with particular reference to *Lemna minor* L. *Canad. J. Res.*, **28**, 356-381.

GROB E.C., 1957. – L'acide mévalonique comme stade précurseur dans la biosynthèse des caroténoïdes par *Mucor hiemalis. Chimia*, **11**, 338-339.

GROB E.C., PORETTI G.G., MURALT A.V. et SCHOPFER W.H., 1951. – Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un microorganisme. *Experientia*, **6**, 218.

GUERN J., 1965. – Corrélations de croissance entre frondes chez les Lemnacées. *Ann. Sci. nat. Bot.*, **6**, 1-156.

HAGER A. et MEYER-BERTENRATH T., 1967. – Die Identifizierung der an Dünnschichten getrennten Carotinoide grüner Blätter und Algen. *Planta*, **76**, 149-168.

HARTMANN K.M., 1966. – A general hypothesis to interpret « High energy phenomena » of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochem. Photobiol.*, **5**, 349-366.

HENNINGSEN K.W., 1967. – An action spectrum for vesicle dispersal in bean plastids. In *Biochemistry of chloroplasts*, Vol. II, T.W. Goodwin éd., Academic Press, Londres et New York, 453-457.

HENSHALL J.D. et GOODWIN T.W., 1964. – The effect of red and far-red light on carotenoid and chlorophyll formation in pea seedlings. *Photochem. Photobiol.*, **3**, 243-247.

HILLMAN W.S., 1957. – Nonphotosynthetic light requirement in *Lemna minor* and its partial satisfaction by kinetin. *Science*, **126**, 165-166.

HUTNER S.H., 1953. – Comparative physiology of heterotrophic growth in plants. In *Growth and differentiation in plants*, W.E. Loomis éd., Iowa State College Press, 417-446.

JACQUES R., 1968. – Etude, par spectrophotométrie *in vivo*, de quelques propriétés nouvelles du phytochrome. *Physiol. Vég.*, **6**, 93-116.

JACQUES R., CHABBAL R., CHOUARD P. et JACQUINOT P., 1964. – Mise au point d'un illuminateur spectral à usage biologique. *C.R. Acad. Sci.*, **259**, 1581-1584.

JOLCHINE G., 1962. – Le métabolisme de l'acide acétique dans les feuilles de *Bryophyllum Daigremontianum* Berger. La genèse des acides organiques par différentes réactions de condensation du radical acétyle dans les chloroplastes et dans la fraction cellulaire non chloroplastique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **44**, 337-364.

KANDELER R., 1960-61. – Lemnaceen als Forschungsobjekt. *Ber. Physik. Med. Ges.*, **70**, 81-86.

KANDELER R., 1962. – Die Aufhebung der photoperiodischen Steuerung bei *Lemna gibba*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **75**, 431-442.

KARRER P. et JUCKER E., 1950. – *Carotenoids*. Elsevier Publishing Company, New York, Amsterdam, Londres et Bruxelles.

KAY R.E. et PHINNEY B., 1956. – Plastid pigment changes in the early seedling leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, **31**, 226-231.

KIRK J.T.O., 1967. – The biochemical basis for plastid autonomy and plastid growth. In *The plastids*, J.T.O. Kirk et R.A.E. Tilney-Bassett éd., Freeman et Cie, Londres et San Francisco, 302-564.

KRINSKY N.I. et GOLDSMITH T.H., 1960. – The carotenoids of the flagellated alga, *Englena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **91**, 271-279.

LABORIE M.E., 1963. – Contribution à l'étude des actions de la gibbérelline et du chlorure de chlorocholine sur le métabolisme des pigments foliaires. II. Actions de la gibbérelline et du CCC sur les teneurs et sur les vitesses de renouvellement des pigments chloroplastiques. *Ann. Physiol. vég.*, **5**, 89-113.

LANDOLT E., 1957. – Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **67**, 271-410.

LOWRY L.K. et CHICHESTER C.O., 1967. – β-ionone and its effect on the incorporation of ^{14}C mevalonate into carotenes and high counting fractions in carrot root. *Photochem. Photobiol.*, **6**, p. 367.

LUNDEGÅRDH H., 1968. – The systems I, II, and III in the photosynthetic cycle of electron transfer. *Physiol. Plant.*, **21**, 148-167.

MACKINNEY G., 1941. – Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. biol. Chem.*, USA, **140**, 315-322.

MARTIN G., 1963. – Différences spécifiques entre les besoins quantitatifs en chlore de *Lemna minor*, *L. Perpusilla* et *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Soil*, **18**, 258-266.

MOHR H., 1966. – Differential gene activation as a mode of action of phytochrome 730. *Photochem. Photobiol.*, **5**, 469-483.

MERCER E.I. et GOODWIN T.W., 1962. – The incorporation of (2-^{14}C) mevalonic acid and $^{14}CO_2$ into the phytyl side chain of chlorophyll in maize seedlings. *Biochem. J.*, **85**, p. 13P.

MONÉGER R., 1956. – Méthode pour l'étude quantitative de l'évolution des pigments liposolubles au cours de la maturation des fruits et du jaunissement des feuilles. *Diplôme d'Etudes Supérieures*, Paris.

MONÉGER R., 1957. – Méthode d'étude de l'évolution des pigments liposolubles des fruits, dérivée de la technique chromatographique de Douin. *Rev. gén. Bot.*, **64**, 593-612.

MONÉGER R., 1965. – Sur une méthode d'extraction des pigments liposolubles. Application à la *Spirodela polyrrhiza* Schleid. *C.R. Acad. Sci.*, **261**, 1074-1076.

MONÉGER R., 1966. – Incorporation de carbone radioactif dans les caroténoïdes de frondes de *Spirodela polyrrhiza* Schleid. exposées à la lumière sur milieu minéral contenant du bicarbonate de sodium ^{14}C, après un séjour prolongé sur milieu sucré. *C.R. Acad. Sci.*, **263**, 52-54.

MONÉGER R., 1968*a*. – Sur la réalisation d'un dispositif ultrasensible permettant de séparer et de doser les caroténoïdes de petits échantillons de frondes étiolées de *Spirodela polyrrhiza* Schleid. *C.R. Acad. Sci.*, **266**, 672-675.

MONÉGER R., 1968*b*. – Un exemple d'application des techniques du froid en physiologie végétale : mise au point d'une méthode pour analyser les effets de la lumière sur la synthèse des caroténoïdes chez les végétaux étiolés. *Rev. gén. Froid*, **59**, 425-451.

MONÉGER R., 1968*c*. – En préparation.

MOSTER J.B. et QUACKENBUSH F.W., 1952. – Effects of temperature and light on the carotenoids of seedlings grown from three corn hybrids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 297-303.

PERKINS H.J. et ROBERTS D.W.A., 1962. – Purification of chlorophylls, pheophytins and pheophorbides for specific activity determinations. *Biochim. Biophys. Acta*, **158**, 486-498.

PHUNG-NHU-HUNG S., 1968. – Communication personnelle.

PIRSON A. et SEIDEL F., 1950. – Zell- und Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium-und Kalziummangel. *Planta*, **38**, 431-473.

POPJAK G. et CORNFORTH J.W., 1960. – The biosynthesis of cholesterol. *Adv. Enzym.*, **22**, 281-335.

PURCELL A.E. et THOMPSON G.A., 1961. – Glucose as a carbon source for carotenes synthesis in tomatoes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 231-237.

ROGERS L.J., SHAH S.P.J. et GOODWIN T.W., 1965. – Intracellular localization of mevalonic kinase in germinating seedlings : its importance in the regulation of terpenoid biosynthesis. *Biochem. J.*, **96**, 7P-8P.

ROGERS L.J., SHAH S.P.J. et GOODWIN T.W., 1966. – Intracellular localization of mevalonate activating enzymes in plant cells. *Biochem. J.*, **99**, 381-386.

SCHNARRENBERGER C. et MOHR H., 1967. – Phytochrome-mediated synthesis of carotenoids in mustard seedlings (*Sinapis alba* L.). *Naturwiss.*, **54**, 648-649.

SCHOPFER W.H. et GROB E.C., 1952. – Sur la biosynthèse du β-carotène par *Phycomyces* sur un milieu contenant de l'acétate de sodium comme unique source de carbone. *Experientia*, **8**, p. 140.

TREHARNE K.J., 1964. – *Ph. D Thesis, University* of Wales. Cité par GOODWIN T.W., 1967. – Terpenoids and chloroplast development. In *Biochemistry of chloroplasts*, T.W. Goodwin éd., Academic Press, Londres et New York, p. 730.

VARMA T.N.R. et CHICHESTER C.O., 1962. – Incorporation of citral ^{14}C and geraniol ^{14}C into β-carotene in carrot root slices : interconversion of citral and geraniol in carrot root slices and by alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 419-422.

VIRGIN H.I., 1964. – Some effects of light on chloroplasts and plant protoplasm. In *Photophysiology*, Vol. I, A.C. Giese éd., Academic Press, New York et Londres, 273-303.

VIRGIN H.I., 1966. – Carotenoid synthesis in leaves of wheat after irradiation by red light. *Physiol. Plant.*, **19**, p. 40.

VIRGIN H.I., 1967. – Carotenoid synthesis in leaves of etiolated wheat seedlings after varying light and dark treatments. *Physiol. Plant.*, **20**, 314-320.

WAGNER E. et MOHR H., 1966. – Kinetic studies to interpret « High-energy phenomena » of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochem. Photobiol.*, **5**, 397-406.

WEEDON B.C.L., 1967. – Carotenoids : recent advances. *Chem. in Britain*, **10**, 424-432.

WIECKOWSKI S. et GOODWIN T.W., 1967. – Studies on the metabolism of the assimilatory pigments in cotyledons of four species of pine seedlings grown in darkness and in light. In *Biochemistry of chloroplasts*, Vol. II, T.W. Goodwin éd., Academic Press, Londres et New York, 445-451.

WHITMORE R.A., 1960. – Light and pigment development in the kidney bean. *Plant Physiol.*, **19**, 569-578.